WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PHENOLEN UND HUMINSTOFFEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ulrich Müller-Wegener
aus Bremen

Göttingen 1976

WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PHENOLEN UND HUMINSTOFFEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Ulrich Müller-Wegener
aus Bremen

Göttingen 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. Ellenberg
Korreferent: Prof. Dr. W. Ziechmann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Theoretischer Teil	2
2.1. Die Huminstoffe	2
2.1.1. Allgemeine Betrachtung	2
2.1.2. Bildung der Huminstoffe	5
2.2. Die Phenole	6
2.2.1. Bindungsmechanismen bei der Phenoloxydation	6
2.2.2. Oxydationsprodukte einiger ausgewählter Phenole	12
3. Experimenteller Teil	19
3.1. Auswahl der Substanzen	19
3.2. Wechselwirkungen zwischen den Phenolen und sich bildenden Modellhuminstoffen aus Hydrochinon	22
3.2.1. Gaswechselmessungen	22
3.2.2. Elektronenspektren	32
3.2.3. Infrarotspektren	41
3.3. Wechselwirkung zwischen Phenolen und Modellhuminsäuren	45
3.3.1. Gaswechselmessungen	45
3.3.2. Elektronenspektren	56
3.3.3. Infrarotspektren	65
3.3.4. Fluoreszenz	69
3.3.5. Chromatographische Untersuchung der Reaktionsprodukte	79
3.3.6. Gelfiltration	82
3.4. Wechselwirkungen zwischen den Phenolen und methylierter Modellhuminsäure	85
3.4.1. Gaswechselmessungen	86
3.4.2. Chromatographie	90
3.4.3. Untersuchungen an "Strukturteilen" der Huminstoffe	91

Seite

3.5. Wechselwirkung der Phenole mit extrahierten natürlichen Huminsäuren 95

4. Diskussion 99

5. Zusammenfassung 112

6. Anhang 114

Literaturverzeichnis 117

1. Einleitung und Problemstellung

Große Mengen Phenole der unterschiedlichsten Struktur gelangen beim Abbau der organischen Substanz des abgestorbenen Pflanzenmaterials in den Boden. Als Hauptlieferant ist hier das Lignin anzusehen, das in großen Mengen sowohl durch Streufall als auch durch Ernterückstände dem Boden zugeführt wird.

Durch Basidiomyceten (Weißfäule), Ascomyceten und Bakterien wird das Lignin von Kohlenhydraten befreit und in niedermolekulare phenolartige Spaltstücke zerlegt.

Als weitere natürliche Phenollieferanten kommen die Tannine und Flavone in Frage, die ebenfalls beim Abbau in niedermolekulare hydroxylierte aromatische Verbindungen zerlegt werden.

Auch die mikrobielle Synthese von phenolischen Verbindungen aus aliphatischen Ausgangssubstanzen findet im Boden statt. So wurde bei einigen Pilzen die Synthese von Dihydroxybenzoesäure aus Zuckern als einziger C-Quelle festgestellt (KONONOVA, ALEKSANDROVA,1956 und 1958; ALEKSANDROVA ,1962).

Neben diesen natürlichen Phenollieferanten ist auch mit einem durch Abwässer verursachten zusätzlichen Anfall von phenolischen Verbindungen zu rechnen. So wurden von NAUCKE und TARKMANN(1964)Abwasserphenole in Torf-Schwelwässern bestimmt. Auch FAUST (a,b) berichtet über Verunreinigungen von Gewässern durch phenolische Verbindungen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich zwischen den in den Boden gelangenden Phenolen und den

Huminstoffen, die einen großen Teil der organischen Bodensubstanz ausmachen, Wechselwirkungen ausbilden. Als weiteres sollte die Art dieser Wechselwirkung aufgeklärt werden, um zusätzlichen Aufschluß über die Genese der Huminstoffe und deren Verhalten nach außen zu erzielen.

2. Theoretischer Teil

2.1. Die Huminstoffe

2.1.1 Allgemeine Betrachtung

Die Huminstoffe bilden eine deutlich zu umreißende Gruppe von Naturstoffen aus der Gesamtheit der im Boden vorkommenden postmortalen Substanzen. Die deutlichste Abgrenzung zu den übrigen organischen Bodeninhaltsstoffen ist durch die braune Farbe und das Elektronenspektrum im Bereich von 300 bis 700 nm geschaffen, welches monoton und vollkommen unstrukturiert zu höheren Wellenlängen hin abnimmt (SCHEFFER, WELTE, 1950; ZIECHMANN, SCHOLZ,1960). Ein weiteres Kriterium, die Huminstoffe in ihrer Gesamtheit zu beschreiben, kann in der Teilchengröße gesehen werden, die von Ausnahmen abgesehen zwischen Teilchenmassen von 1 000 und 10 000 liegt.

Daß eine einheitliche Struktur oder auch nur ein Bauprinzip nicht gefunden wurde, STADNIKOFF (1930) u.v.a. waren noch um eine exakte Strukturaufklärung bemüht, kann nicht verwundern. Es ist davon auszugehen, daß alle organischen Bodeninhaltsstoffe, wenn sie nicht dem Totalabbau unterliegen, in die Humifizierung miteinbezogen werden. Die Universalität dieser Stoffklasse ist also durch die Verknüpfung unterschiedlichster Bausteine durch wechselnde Bindungen begründet.

Dennoch kann an diesem heterogenen Material eine sinnvolle Untergliederung durchgeführt werden (ZIECHMANN in: ZIECHMANN, ROCHUS, 1971). Es ist zweckmäßig und mit den Experimenten in Übereinstimmung, die Huminstoffe mit physikalisch-chemischen Messungen (siehe Tab.:1) zu klassifizieren. Das System der Huminstoffe ist anhand dieser Kriterien in drei Gruppen zu gliedern:

Huminsäurevorstufen (HsV)
Huminsäuren (Hs)
Humine (H)

Tab.: 1 Zur Unterscheidung von Huminsäurevorstufen (HsV), Huminsäuren (Hs) und Huminen (H) im System der Huminstoffe (nach ZIECHMANN, 1961, verändert)

	System der Huminstoffe		
	HsV (1)	Hs (2)	H (3)
Teilchenmassen (TM)	TM_{HsV} <	TM_{Hs} <	TM_{H}
Die Teilchenmasse streut im System der Huminstoffe zwischen 1 000 und 10 000 TM			
funktionelle Gruppen	für (1) und (2) keine qualitativen, wohl aber quantitative Unterschiede. Nachgewiesen: $-C-OH_{(phen.)}$, $-COOH$; $>C=O_{(chin.)}$; ferner: $-NH_2$, $>NH$, $\gg N_{(heterocycl.)}$, $-C-\underset{H}{N}-C$; $-CH_3$, $>CH_2$, $\gg CH$, $-OCH_3$		

	HsV (1)	Hs (2)	H (3)
Wanderung im elektrischen Feld: Elektrophorese)	ausgeprägt	minimal	keine
Lichtabsorption: UV - Bereich	Maxima bzw. Schultern 250-300 nm	evtl. Schultern, sonst monotoner Verlauf	monotoner Verlauf
IR - Bereich	schärfere (wenn auch verh. wenige Banden)	hohe Untergrundabsorption; wenig typische, aufgeweitete Banden	kaum ausgeprägte Spektren; hohe Untergrundabsorption
reaktives Verhalten	HsV ⟶	Hs ⟶	kaum chem. reaktionsfähig

Über das Verhalten der Huminstoffe gegenüber den Pflanzen kann Allgemeingültiges nicht gesagt werden, doch ist auf eine Anzahl von Arbeiten zu verweisen, in denen über die Beeinflussung der Pflanzen durch die Huminstoffe berichtet wird. Als physiologisch beeinflussender Faktor wurden die Huminstoffe durch Wirkung auf die Keimung (FLAIG und SAALBACH,1955b), das Sproß- und Wurzelwachstum (SAALBACH,1955; FLAIG und SAALBACH, 1955a; OTTO,1952), den Kohlenhydratstoffwechsel (FLAIG, SCHARRER, SCHOLL,1957a) sowie der Nährstoff- (FLAIG, SAALBACH, SCHOBINGER,1960) und speziell der Phosphataufnahme (ROCHUS,1971; FLAIG, SCHARRER, SCHOLL,1957b) beschrieben.

Eine deutliche Beeinflussung der Enzymaktivität durch Huminstoffe konnte am Beispiel der Urease gezeigt werden (KRAMER,1965), wobei sogar für unterschiedliche Huminstoffpräparate jeweils unterschiedliche Hemmungen zu ermitteln waren.

Neben diesen direkten Einwirkungen können die Huminstoffe überden Pflanzenstandort indirekt das Wachstum der

Pflanze beeinflussen. So zeigte WALLACE (1956), daß an Huminstoffe gebundene Schwermetallionen (z.B. Fe, Zn, Mn, Cu) zwar noch pflanzenverfügbar sind, aber durch die Bindung an die Huminstoffe nicht mehr so stark der Auswaschung unterliegen. Auch muß hier die erhebliche Erhöhung der Kationenumtauschkapazität (KUK) der Böden durch die Huminstoffe erwähnt werden (KHAN,1968).

2.1.2. Bildung der Huminstoffe

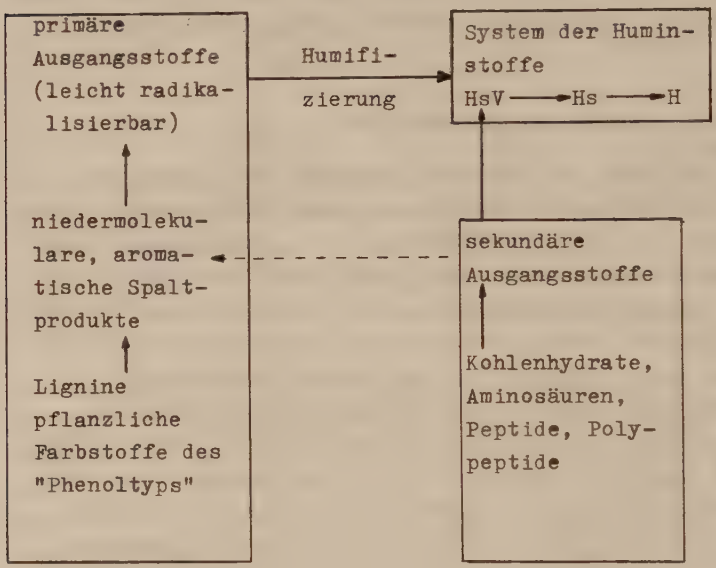
Im Gegensatz zu einem Konzept, das die Bildung der Huminstoffe auf aliphatische Ausgangssubstanzen zurückführt, so auf Kohlenhydrate, die zu Furankörpern umgewandelt werden (MARCUSSON,1925) oder Carbonoyl - und primäre Aminoverbindungen, die zu Melanoidinen weiterreagieren (ENDERS,1942a,b,1943), wurden Vorstellungen entwickelt, wonach niedermolekulare aromatische Substanzen durch die unterschiedlichsten Reaktionen miteinander schließlich zu Huminstoffen verändert werden. Die einleitende und damit bestimmende Phase der Humifizierung ist in einer Radikalreaktion zu sehen (ZIECHMANN,1963). Durch die steigende Teilchenmasse und die damit verbundene Stabilisierung des Radikals durch weitere Mesomeriemöglichkeiten kommt die Reaktion dann zum Stillstand.

Dieses Konzept konnte für die aus dem Boden extrahierten Huminstoffe durch Messungen der Elektronen-Spin-Resonanz bestätigt werden: Es wurde eine beachtliche Konzentration von freien Radikalen in den Huminstoffen nachgewiesen (STEELINK, 1966; STEELINK and TOLLIN ,1962; KLEIST und MÜCKE,1966).

Neben dieser Hauptreaktion der Humifizierung und anschließend an diese sind weitere Reaktionen möglich, die dann aliphatische Strukturteile einführen. Um aber eine gewisse Übersichtlichkeit zu wahren, sollte, wie ZIECHMANN, KRESS(1970) vorschlugen, zwischen primären

(existenziellen) und sekundären (fakultativen) Ausgangsstoffen der Humifizierung unterschieden werden.

Schema 1: Bildung der Huminstoffe (ZIECHMANN,1974, verändert)



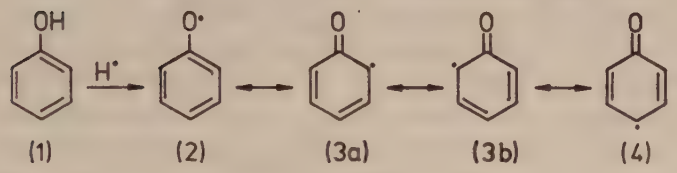
2.2 Die Phenole

Aus der sehr großen Vielzahl der Reaktionsmöglichkeiten der Phenole und den verschiedensten Zwischen- und Endprodukten (siehe dazu u.a. MUSSO,1967) soll hier nur ein kleiner Überblick gegeben werden.

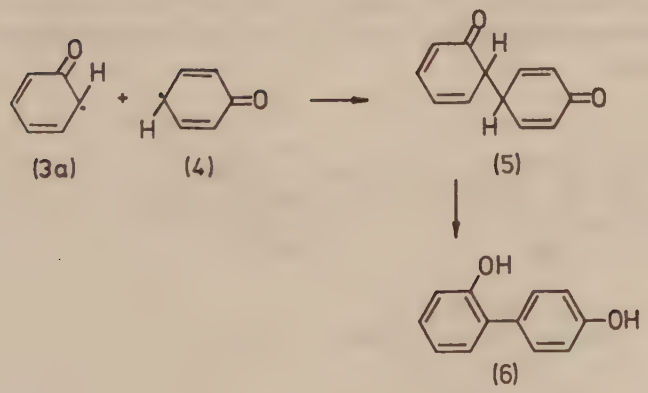
2.2.1. Bindungsmechanismen bei der Phenoloxydation

Als Grundlage für die meisten Bindungsmechanismen dient die Vorstellung, daß die Phenole über freie Radikale reagieren. Die Kopplung kann dabei nur in der ortho- oder para-Stellung erfolgen (MUSSO,1967), so daß

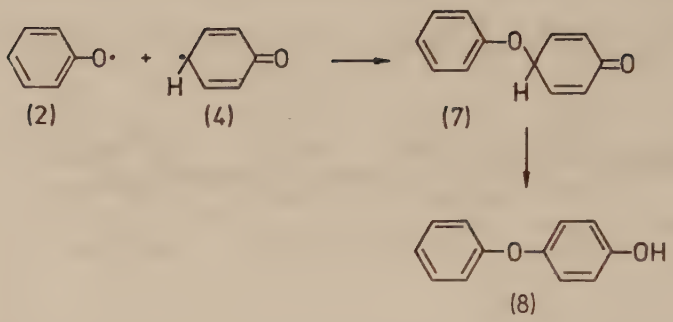
folgende Mesomeriestrukturen des Radikals für die Reaktion zur Verfügung stehen (2), (3), (4):



Als erste Möglichkeit der Reaktion wäre eine Verbindung von zwei Radikalen zu betrachten:

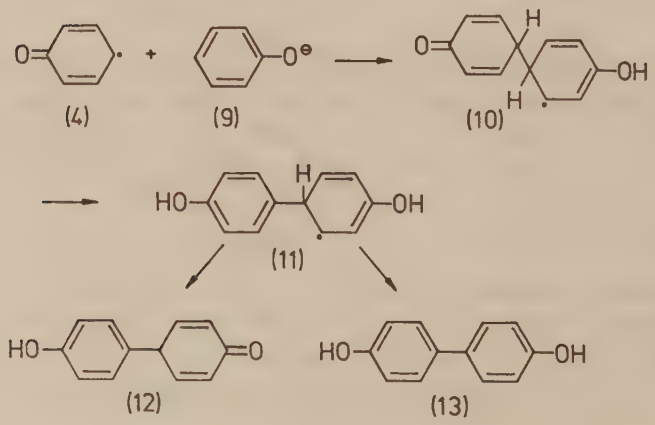


oder



Eine Weiterreaktion der Dimeren erfolgt dann nach einer erneuten Radikalisierung, deren Geschwindigkeit natürlich vom Potential des Oxydationsmittels abhängt. Dimere, die als Peroxide aufzufassen wären, wie sie etwa bei einer Verbindung von zwei Radikalen (2) entstehen würden, konnten nicht nachgewiesen werden (MÜLLER, SCHURR, SCHEFFLER, 1959; DIMROTH, BERNDT, 1964; HEWGILL, KENNEDY, 1966).

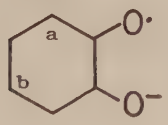
Als zweite Möglichkeit der Reaktion ist die Verknüpfung des freien Phenoxyradikals (z.B.(4))mit einem Phenolation (9) anzusehen.

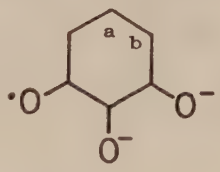


Die dabei entstehenden dimeren Radikale (10), (11) werden zu (12) und (13) weiteroxydiert.

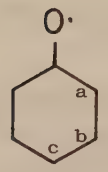
Ein gewisser Anhalt darüber, aus welcher der möglichen mesomeren Strukturen heraus das Radikal reagiert, kann durch die Ermittlung der Spindichte aus den ESR-Spektren gewonnen werden. Für das Phenoxyradikal, also das Radikal der Monohydroxyphenole, gilt allgemein, daß die größte Aufenthaltswahrscheinlichkeit des freien Elektrons am Sauerstoffatom und am para-Kohlenstoffatom anzunehmen ist (WATERS,1964; STONE,WATERS, 1964).

In dieser Aufstellung sind neben dem Phenoxyradikal noch einige Beispiele für die Spindichteverteilung von Semichinonen dargestellt (MUSSO, 1967).

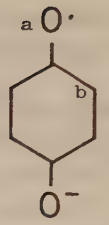




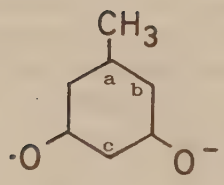
Position	α	Position	α
a	1.02	a	5.66
b	3,58	b	0.99



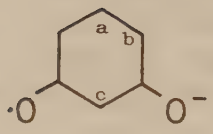
Position	α
a	6.6
b	1.9
c	10.1



Position	α
a	(^{17}O) 9.02
b	(H) 2.35

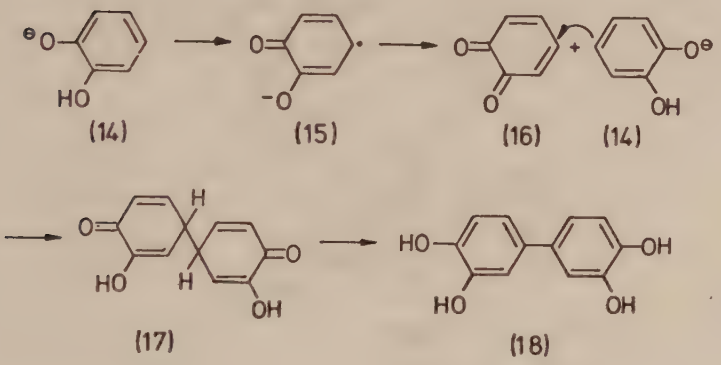


Position	α
a	2.3
b	11.1
c	C.8

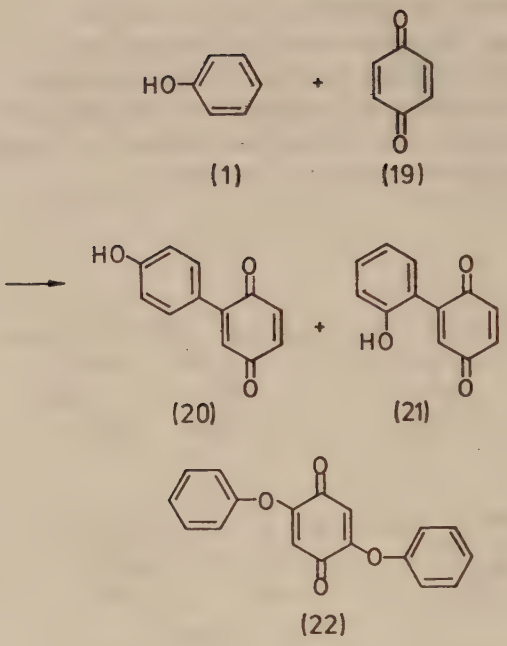


Position	α
a	2.4
b	11.2
c	0.7

Eine Möglichkeit der Kopplung von Phenolen sollte noch erwähnt werden: Es handelt sich hier um die Addition von einem Phenolation an ein Chinon. Das Phenol (14) wird hier, wenn es sich um die Kopplung zweier Teilchen der gleichen Ausgangssubstanz handelt, über die Radikalstufe (15) weiter zum Chinon (16) oxydiert, welches dann das Phenolation (14) addiert.



Findet die Bindung aber zwischen zwei Teilchen unterschiedlicher Ausgangssubstanz statt, z.B. (1) und (19), so entstehen die Zwischenprodukte (20),(21) oder (22), die dann aber weiter zu Polymeren oxydiert werden.



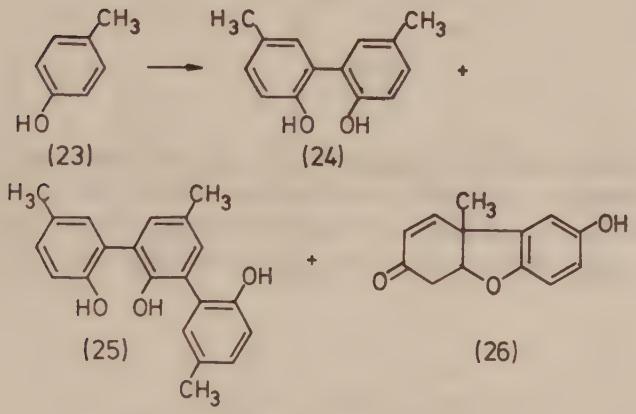
Diese Reaktionen sind allerdings nur wahrscheinlich, wenn das Phenolation in hohen Konzentrationen vorliegt, und ganz besonders, wenn die Ausgangssubstanzen der Reaktion durch Substituenten stabilisiert sind.

2.2.2. Oxydationsprodukte einiger ausgewählter Phenole

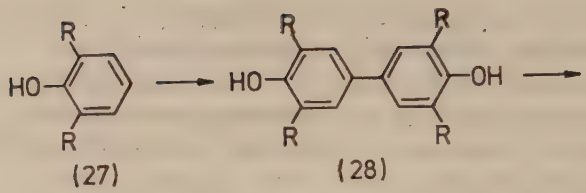
Allgemein kann für die Oxydation der Phenole davon ausgegangen werden, daß die di-, tri- oder polymeren Reaktionsprodukte durch C - C oder C - O Bindungen ausschließlich in para-oder ortho-Stellung zur Hydroxygruppe oder direkt an dieser aus den Ausgangsphenolen

gebildet werden, wobei jeweils ein Wasserstoffatom abgespalten wird (MUSSO,1967).

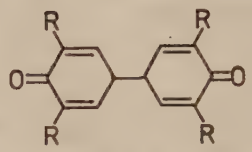
So entstehen bei der Oxydation des p-Kresols (23) in alkalischer wässriger Lösung mit Kaliumeisencyanid als Katalysator dimere (24), trimere (25) und polymere Verbindungen. Auch die Bildung des PUMMERER'schen Ketons (26) ist möglich (PUMMERER, PUTTFARCKEN, SCHOPFLOCHER, 1925; BARTON, DEFLORIN, EDWARDS, 1955, 1956; ARKLEY, DEAN, ROBERTSON, SIDISUNTHORN, 1956).



Für das Phenol (27) kann die Reaktion zu Dimeren (28) ebenfalls beobachtet werden, wobei aber durch starke Oxydationsmittel eine Umwandlung zum Diphenochinon (29) stattfindet (MUSSO, 1967).

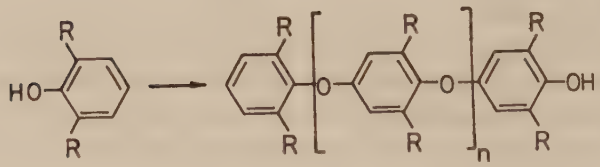


(27) (28)



(29)

Neben diesen beiden Arten für die C - C - Verknüpfung durch Oxydation ist hier auch die Möglichkeit der C - O - Verknüpfung zu beachten; so konnten polymere Äther (30) bei der Oxydation des Phenols (27) isoliert werden.

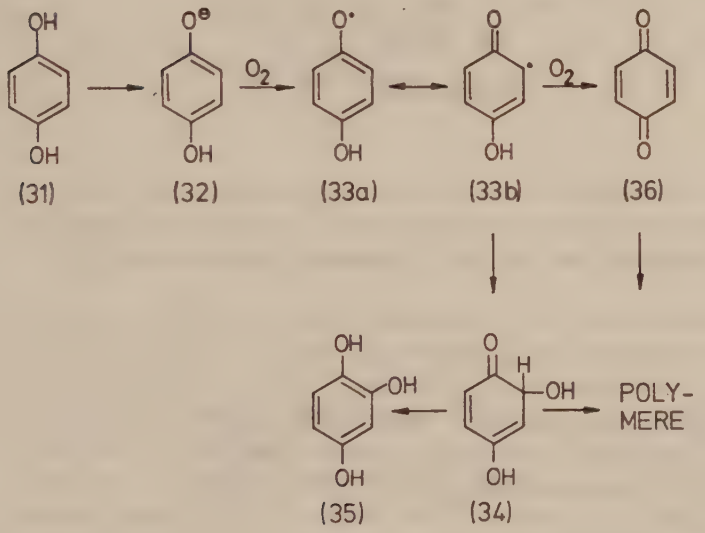


(27) (30)

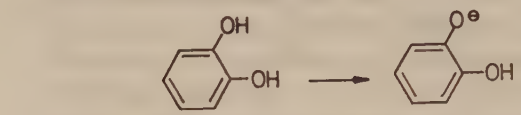
Das Hydrochinon bildet bei der Oxydation mit Luft in alkalischer Lösung sehr schnell eine Vielzahl von Polymeren, aus denen sich dann Substanzen bilden, die den Huminstoffen ähnlich sind. Diese Reaktionen sind vollkommen unübersichtlich; es wurde daher nur die Eingangs-

reaktion eingehend betrachtet (DIEBLER, EIGEN, MATTHIES, 1961; EIGEN, MATTHIES,1961).

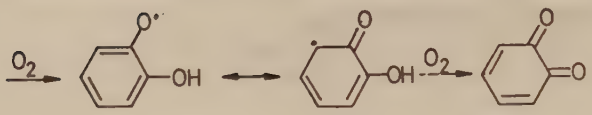
Aus dem Hydrochinon (31) entsteht in alkalischer Lösung das Anion (32), dem dann vom Sauerstoffbiradikal ein Elektron entnommen wird, so daß das Semichinonradikal (33a,b) entsteht (ZIECHMANN,1960). Dieses reagiert aus einer der mesomeren Strukturen heraus weiter, wahrscheinlich (33b) (siehe 1.2.1.), so daß z.B. über (34) das Hydroxyhydrochinon (35) gebildet wird. Die zweite Möglichkeit wäre, durch Abgabe eines weiteren Elektrons zum p-Benzochinon (36) zu kommen.



Das Brenzkatechin (37) wird zum o-Chinon (38) oxydiert, das allerdings nicht so stabil ist wie das p-Chinon, so daß sich in wässriger Lösung ebenfalls Polymere bilden (MUSSO, 1967).



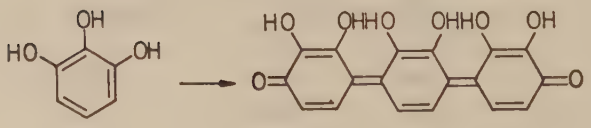
(37)



(38)

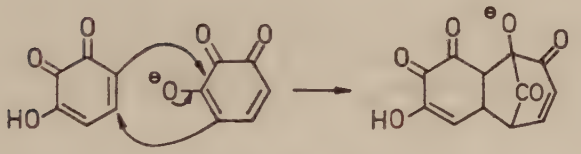
POLYMERE

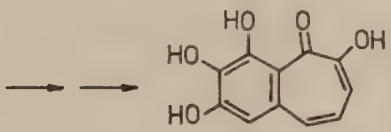
Für das Pyrogallol (39) wurden bei der Oxydation mit Sauerstoff neben einer Vielzahl von Dimeren und Trimeren auch Polymere der Art (40) gefunden (NIERENSTEIN,1915).



(39) (40)

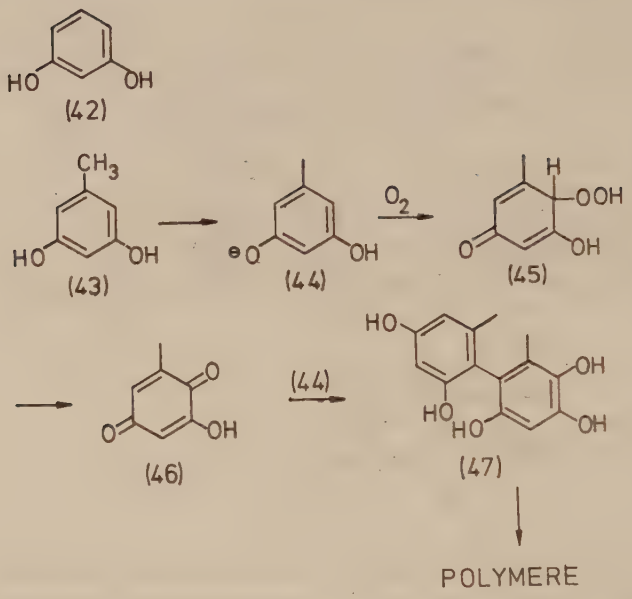
Als weiteres Reaktionsprodukt wurde von SALFELD (1957) das Purpurogallin (42) identifiziert (siehe auch: HORNER, DÜRKHEIMER , 1959; HORNER,WEBER, DÜRKHEIMER , 1961).



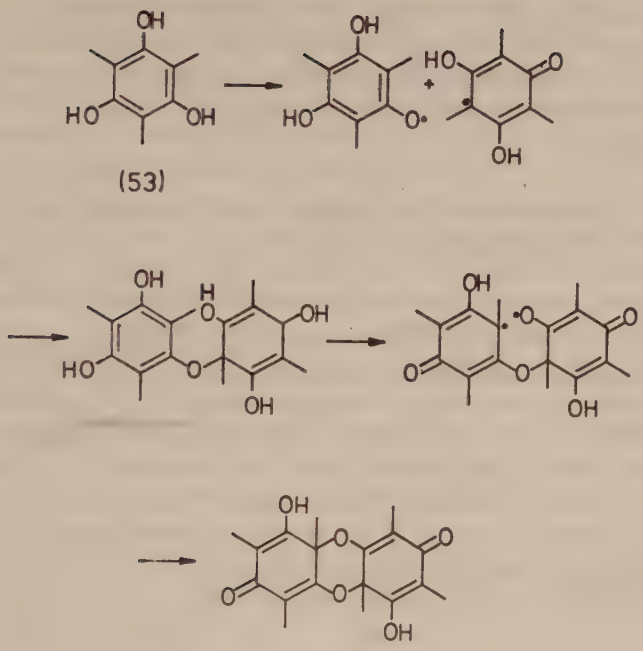


(41)

In alkalischer wässriger Lösung mit Luft oder Sauerstoff als Oxydationsmittel verläuft die Autoxydation des Resorcins (42) und des Orcins (43) über das Anion (44), Chinonhydroperoxid (45) zum Hydroxychinon (46). Hier wird jetzt ein Anion von (42) bzw. (43) addiert, so daß das dimere Hydroxyhydrochinon (47) entsteht (MUSSO, 1967). Dieses wird ebenfalls zu braunen Polymerisaten weiter oxydiert, die keine definierte Struktur mehr aufweisen.



Die Oxydation des Phloroglucins ergibt u . a. Dimere, die durch C - O - Verknüpfung miteinander verbunden sind, wie es hier am Beispiel des Trimethylphloroglucin (53) dargestellt ist (BARTON, COHEN, 1957).



(53)

3. Experimenteller Teil

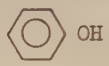
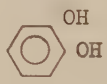
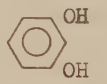
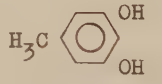
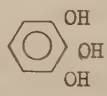
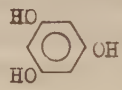
3.1. Auswahl der Substanzen

Um Aufschlüsse über die Wechselwirkungen zwischen Phenolen und Huminstoffen im Boden gewinnen zu können, mußte für die hier durchgeführten Versuche ein möglichst breites Spektrum aus der Klasse der Phenole ausgewählt werden.

Ausgehend von dem einfachsten, dem Phenol, wurde hauptsächlich die steigende OH-Substitution verfolgt. Gleichzeitig konnte mit dieser Auswahl ein weites Feld der

"Reaktionsfähigkeit" erfaßt werden, denn die Redoxpotentiale, hier die als kritische Oxydationspotentiale von FIESER (1930) ermittelten Werte, reichen von 1,089 V für das Phenol herunter bis 0,609 V für das Pyrogallol.

Tab.: 2 Strukturen und kritische Oxydationspotentiale der verwendeten Phenole

	Struktur	kritisches Oxydationspotential (V)
(1) Phenol		1,089
(2) p-Kresol		1,038
(3) Hydrochinon		0,715
(4) Brenzkatechin		0,742
(6) Resorcin		1,043
(7) Orcin		---
(5) Pyrogallol		0,609
(8) Phloroglucin		0,799

Weiter sprach für die Auswahl dieser Phenole, daß sie in alkalischem Milieu zur Autoxydation neigen, wobei sie, mit Ausnahme des Resorcin, mehr oder weniger

Sauerstoff aufnehmen. Diese Sauerstoffaufnahme kann als Maß für die zur Autoxydation zur Verfügung stehende Menge der eingesetzten Phenole benutzt werden, so daß Konzentrationsänderungen der Phenole durch Bindung dann vermittels einer Verminderung der Sauerstoffaufnahmen der Lösung festgestellt werden können.

Bei der Auswahl der Huminstoffe mußte beachtet werden, daß die Bindung der Phenole an die Huminstoffe sowohl während deren Entstehung vor sich gehen kann als auch in der Art, daß im Bodenmilieu eine Bindung zwischen den Huminsäuren und den Phenolen geknüpft wird. Die Untersuchung in statu nascendi konnte nur am Modell vorgenommen werden, obwohl auch isolierte Huminsäurevorstufen zu Huminsäuren zu oxydieren wären, doch stellt die Präparation unveränderter Vorstufen ein bis heute noch ungelöstes Problem dar. Es wurde hier die in der Literatur schon oft beschriebene Bildung von Modellhuminstoffen aus Hydrochinon herangezogen (ZIECHMANN, 1959, 1960 a,b).

Da bei allen bisher bekannten Extraktionsverfahren die Huminstoffe entweder verändert werden (etwa durch die Anwendung anorganischer Säuren und Basen) oder aber eine Verunreinigung durch organische Begleitsubstanzen des Bodens nicht auszuschließen ist, wurde bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Huminstoffen und den Phenolen auf die Modellhuminsäuren aus Hydrochinon zurückgegriffen. So konnte dann auch der großen Unübersichtlichkeit natürlicher Huminstoffsysteme ausgewichen werden.

An einem Beispiel soll anschließend die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die natürlichen Huminsäuren gezeigt werden. Hierfür wurde eine Huminsäure aus dem Wachstumskomplex des Sonnenberger Moors, gewonnen mit anorganischen Solventien, benutzt (über die Gewinnung siehe: MÜLLER, 1972).

3.2. Wechselwirkungen zwischen den Phenolen und sich bildenden Modellhuminstoffen aus Hydrochinon

Die größte Wahrscheinlichkeit, daß Wechselwirkungen zwischen Phenolen und Huminstoffen stattfinden, ist zweifellos dann vorhanden, wenn beide Systeme in optimaler Reaktionsbereitschaft vorliegen. Es wurde daher begonnen, die Wechselwirkungen während der Bildung der Huminstoffe zu studieren, denn hier sind sowohl die sich bildenden Modellhuminstoffe als auch die eingesetzten Phenole sehr reaktionsfähig.

Um eine zügige Bildung der Modellhuminstoffe zu gewährleisten, wurde die Reaktion in alkalischem Milieu durchgeführt. Die angestrebte Einhaltung von den im Boden vorliegenden Bedingungen andererseits setzte einer zu starken Alkalisierung Grenzen, so daß das Reaktionsmilieu auf einen pH-Wert von 8,0 festgesetzt wurde. Eine Verschiebung des pH-Wertes durch Einsetzen der unterschiedlichen Phenole oder Bildung von Reaktionsnebenprodukten wurde durch die Verwendung eines Phosphatpuffers pH 8,0 verhindert.

3.2.1. Gaswechselmessungen

Im alkalischen Milieu verändert sich Hydrochinon autoxydativ unter Sauerstoffaufnahme und Braunfärbung. Diese Sauerstoffaufnahme ist abhängig vom pH-Wert, der Temperatur, dem Sauerstoffpartialdruck und der Menge des Hydrochinons. Werden jetzt die anderen Parameter konstant gehalten, dann ist die Sauerstoffaufnahme ein Maß für die Menge der reagierenden Teilchen des sich bildenden Modellhuminstoffs.
Wird nun zu einer autoxydierenden Hydrochinonlösung eines der ausgewählten Phenole gegeben, so sind in bezug auf die Sauerstoffaufnahme der sich bildenden Huminstoffe zwei Möglichkeiten denkbar:

1. Die Sauerstoffaufnahme der Kombinationslösung entspricht genau der Summe der Sauerstoffaufnahmen der Lösungen der Einzelkomponenten (also Sauerstoffaufnahme der Kombinationslösung gleich Sauerstoffaufnahme der sich bildenden Modellhuminstoffe plus Sauerstoffaufnahme der Phenollösung)
2. Die Sauerstoffaufnahme der Kombinationslösung ist ungleich der Summe der Sauerstoffaufnahmen der Lösungen der Einzelkomponenten.

Die zweite Möglichkeit läßt auf eine Wechselwirkung der eingesetzten Phenollösung mit den sich bildenden Modellhuminstoffen schließen, die durch eine Veränderung der Sauerstoffaufnahme meßbar ist. Diesem Ansatz wurde durch Gaswechselmessungen mit der Warburg-Apparatur nachgegangen.

Als Lösungsmittel wurde m/15 Phosphatpuffer pH 8,0 nach Soerensen verwandt, was einerseits eine hinreichend schnelle Bildung der Modellhuminstoffe gewährleistete, andererseits aber auch noch in etwa bodennahe Verhältnisse schuf.

Als Ausgangsprodukt für die Modellhuminsäuren wurde eine wässrige Hydrochinonlösung 0,1875 m hergestellt. Die einzusetzenden Phenole wurden ebenfalls in wässrigen Lösungen mit der Konzentration von 0,1875 m angesetzt. Da von diesen Lösungen 0,2 ml auf das Reaktionsvolumen von 3,0 ml gebracht wurden, waren die Konzentrationen zu Beginn der Reaktion beim Hydrochinon und bei den Phenollösungen je 0,0125 m. Diese Mengen hatten sich im Vorversuch als optimal in bezug auf die Sauerstoffaufnahme herausgestellt.

Die Füllung der Warburg-Gefäße erfolgte nach folgendem Schema:

Tab.: 3 Füllplan für die Warburg-Versuche (schematisch)

Gefäß-Nr.	Bezeichnung	Hauptraum	Seitenarm 1	Seitenarm 2
1	Thermobarometer	2.6 ml Puffer	0.2 ml Wasser	0.2 ml Wasser
2	Thermobarometer	"	"	"
3	Hydrochinon 1	"	0.2 ml Hydrochinonlsg.	"
4	" 2	"	"	"
5	" 3	"	"	"
6	Phenollsg. 1	"	0.2 ml Wasser	0.2 ml Phenollsg.
7	" 2	"	"	"
8	" 3	"	"	"
9	Kombinationslsg. 1	"	0.2 ml Hydrochinonlsg.	0.2 ml Phenollsg.
10	" 2	"	"	"
11	" 3	"	"	"

Zum Zeitpunkt t=0, dem Reaktionsbeginn, wurden die Lösungen aus den Seitenarmen quantitativ in den Hauptraum überführt. Durch eine Schüttelfrequenz von 70 min^{-1} ist eine ausreichende Sättigung der Reaktionslösung mit Sauerstoff jederzeit sichergestellt. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 30°C entsprechend 303 K durchgeführt.

Die Ermittlung des Volumens der aufgenommenen oder abgegebenen Sauerstoffmenge erfolgt nach der Formel:

$$V = h' \cdot \frac{V_g \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_o} = h' \cdot k \ (\mu l)$$

Es bedeuten dabei:

V = Gaswechselvolumen (µl) bezogen auf Normalbedingungen (760 mm Hg, $0^{o}C$)

h' = Druckänderung (mm Brodie-Lösung), ermittelt durch Differenzbildung der Manometeranzeige zu den Meßzeiten am Versuchsgefäß, korrigiert um die Differenz am Thermobarometer

k = Gefäßkonstante

V_g = Gasvolumen (µl), entsprechend dem Gesamtvolumen von Manometer und Gefäß, vermindert um das Volumen der eingesetzten Reaktionslösung

T = Versuchstemperatur (K)

V_f = Volumen der eingesetzten Reaktionslösung (µl)

α = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient für das zu messende Gas bei der Temperatur T (er bezeichnet die Menge Gas in ml, die in der eingesetzten Flüssigkeit pro ml bei T gelöst ist)

P_o = Normaldruck = 760 mm Hg = 10 322 mm H_2O = 10 000 mm Brodie-Lösung

Veränderungen des Außendrucks und der Temperatur werden am Thermobarometer festgestellt und durch Berücksichtigung bei der Messung der Druckdifferenz an den Einzelmanometern eliminiert.

Am Beispiel der Sauerstoffaufnahme der Reaktionslösung aus dem sich bildenden Modellhuminstoff und Brenzkatechin (Abb.: 1) sei der grundsätzliche Verlauf der ermittelten Sauerstoffverbrauchskurven gezeigt.

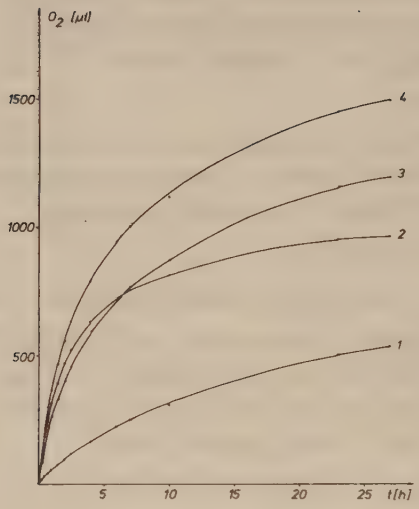


Abb.:1 Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Wechselwirkung zwischen sich bildenden Modellhuminstoffen und Brenzkatechin in Puffer pH 8,0

(1) Sauerstoffaufnahme des Brenzkatechin 0,0125 m

(2) Sauerstoffaufnahme der sich bildenden Huminstoffe aus Hydrochinon 0,0125 m

(3) Sauerstoffaufnahme der Kombinationslösung aus 0,0125 m Brenzkatechin und sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon 0,0125 m

(4) Summe der Einzelsauerstoffaufnahmen von (1) und (2)

Zwischen der zu erwartenden Sauerstoffaufnahme der Kombinationslösung (Kurve 4) und der tatsächlich gemessenen (Kurve 3) wurde für alle Phenole eine Differenz ermittelt.
Wird nun diese Differenz als ΔO_2 gegen die Zeit in einer Darstellung aufgetragen, so entstehen Kurven, wie sie für das Beispiel der Reaktion des Brenzkatechins mit den sich bildenden Modellhuminstoffen abgebildet sind (Abb.2).

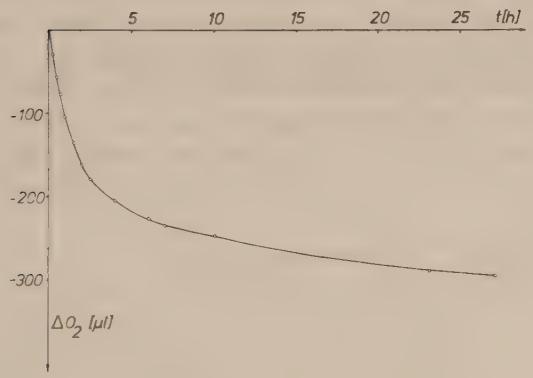


Abb.:2 Differenz der Sauerstoffaufnahmen der Kombination und der Summe der Sauerstoffaufnahmen der Einzelkomponenten der Reaktion zwischen den sich aus Hydrochinon bildenden Modellhuminstoffen und Brenzkatechin

Abb.3 faßt die Differenzkurven aller untersuchten Phenole bei der Reaktion mit dem sich bildenden Huminstoff zusammen.

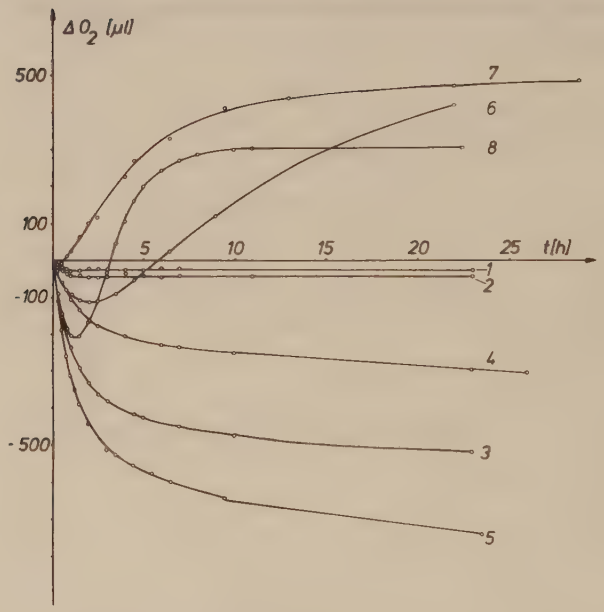
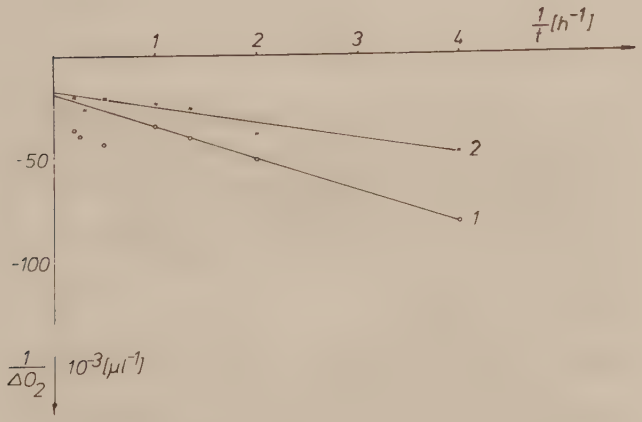


Abb.:3 Verlauf der Differenzen der Sauerstoffaufnahmen aus den Kombinationen und den Summen der Sauerstoffaufnahmen der Einzelkomponenten der Reaktionen zwischen den sich bildenden Modellhuminstoffen aus Hydrochinon (0,0125 m) und den angegebenen Phenolen

(1) Phenol
(2) p-Kresol
(3) Hydrochinon
(4) Brenzkatechin
(5) Pyrogallol
(6) Resorcin
(7) Orcin
(8) Phloroglucin
jeweils in einer Konzentration von 0,0125 m

Es ist deutlich zu ersehen, daß alle eingesetzten Phenole bezüglich der Sauerstoffaufnahme ein anderes Verhalten zeigen, wenn sie mit den sich bildenden Huminstoffen zusammen autoxydieren, als wenn sie allein im hier verwandten Lösungsmittel reagieren.

Für die einzelnen Phenole bestehen nicht nur graduelle, sondern auch prinzipielle Abweichungen bezüglich der Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme des humifizierenden Hydrochinons. Für einige Phenole läßt sich, auch im Hinblick auf die Auswertung der Warburg-Versuche mit den Modellhuminsäuren, ein besserer Vergleich durch die Darstellungsart der Differenzkurven ermöglichen, bei der jeweils die Kehrwerte der Koordinaten der einzelnen Punkte jeder Kurve aufgetragen werden. Wie aus den Abb.4 und 5 hervorgeht, entstehen dann Geraden, allerdings nur unter der Voraussetzung, daß die Kurven in der Abb.3 stetig und ohne Minima verlaufen, also den Typ einer Sättigungskurve darstellen.



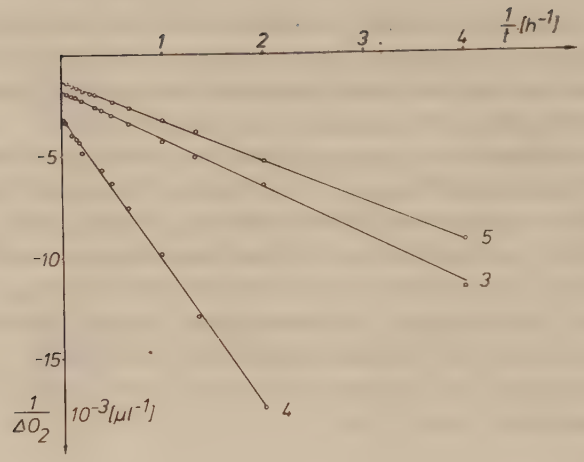


Abb.:4,5 Verlauf der Differenz der Sauerstoffaufnahme aus der Kombination und der Summe der Einzelaufnahmen, also der Sauerstoffmehr- bzw. minderaufnahme der Kombination aus der Reaktion der sich bildenden Modellhuminsäure aus Hydrochinon (0,0125 m) und den Phenolen (0,0125 m) in reziproker Auftragung

Abb.4 (1) Phenol
(2) p-Kresol

Abb.5 (3) Hydrochinon
(4) Brenzkatechin
(5) Pyrogallol

Ganz deutlich abzusetzen sind von den in Abb.4 und Abb.5 dargestellten die m-substituierten Phenole Resorcin, Orcin und Phloroglucin, bei denen eine Auswertung in der oben dargestellten Weise nicht möglich ist, da deren Differenzkurven durch ein Minimum gehen (siehe Abb.3).

Aus den Abb. 4,5 können über die Gleichungen für die Geraden auch die Werte für die maximale Sauerstoffdifferenz ΔO_2 max zwischen der Kombinationslösung und der rechnerisch ermittelten Summe aus den Einzelkomponenten als Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ermittelt werden (es gilt $\frac{1}{t} = o$ also $t = \infty$). Damit kann eine mathematische Beziehung für die Autoxydation eines kombinierten Systems aufgezeigt werden, die, ein bestimmtes Verhalten der Reaktionslösung vorausgesetzt, das System bezüglich der Sauerstoffaufnahmedifferenz quantitativ exakt beschreibt.

Tab.:4 Maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz (ΔO_2 max) für die Reaktionen zwischen den sich bildenden Huminsäuren aus Hydrochinon und Phenolen

Phenol	Geradengleichung	ΔO_2max (µl)
(1) Phenol	$y = 0{,}016\ x - 18{,}5 \cdot 10^{-3}$	-55
(2) p-Kresol	$y = 0{,}008\ x - 16{,}5 \cdot 10^{-3}$	-67
(3) Hydrochinon	$y = 0{,}0024\ x - 1{,}8 \cdot 10^{-3}$	-550
(4) Brenzkatechin	$y = 0{,}0031\ x - 3{,}1 \cdot 10^{-3}$	-320
(5) Pyrogallol	$y = 0{,}002\ x - 1{,}3 \cdot 10^{-3}$	-769
(6) Resorcin		ca +550 1)
(7) Orcin		ca +450 1)
(8) Phloroglucin		ca + 300 1)

1) Diese Werte wurden aus den Differenzenkurven $\Delta O_2/t$ direkt ermittelt, um einen ungefähren Vergleich zu gestatten.

3.2.2. Elektronenspektren

Eine weitere Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen dem autoxydierenden Hydrochinon, also dem sich bildenden Modellhuminstoff und den Phenolen aufzuzeigen und zu quantifizieren, besteht anhand der Elektronenspektren. Im Bereich zwischen 210 und 360 nm wird bevorzugt gemessen, da in diesem Teil des UV - Bereichs die Phenole recht deutliche Absorptionen aufweisen. Im sichtbaren Bereich des Spektrums unter 360 nm zeigen die Huminsäuren den für sie typischen Verlauf abnehmender Extinktion, während die Phenole hier zumeist nicht oder nur noch gering absorbieren.

Zwei Kriterien sind bei den Spektren zur Klassifizierung von Bedeutung:

1. Verschiebung von Banden aus den Spektren der Einzelkomponenten gegenüber dem Spektrum der Kombinationslösung
2. Intensitätsunterschiede der Absorption in den Maxima der Spektren der Kombination verglichen mit der Summe der Absorptionen der Spektren der jeweiligen Einzelkomponenten.

Bei der Intensitätsbetrachtung wird davon ausgegangen, daß die Kombinationslösung Extinktionswerte aufweist, die der Summe der Einzelextinktionen entsprechen, denn es wurden jeweils gleiche Konzentrationen gleicher Stoffe eingesetzt.

Die Spektren wurden nach Abschluß der Warburg-Versuche (siehe 3.2.1.) von der jeweiligen Reaktionslösung aufgenommen. Die Verdünnung für die Aufnahme im UV-Bereich betrug 0,1 ml Lösung + 4,9 ml Puffer pH 8,0 und für den sichtbaren Bereich 1,0 ml Lösung + 4,0 ml Puffer pH 8,0. Durch die Verdünnung mit Puffer pH 8,0 ist sichergestellt, daß die beobachteten Bandenverschiebungen nicht auf pH-Wertverschiebungen zurückzuführen sind.

Für das Phenol und das p-Kresol konnten aus den Absorptionsspektren im UV- und sichtbaren Bereich keine

Rückschlüsse auf eine Bindung zwischen den Phenolen und den sich bildenden Huminstoffen gewonnen werden.

Hingegen konnten für die übrigen untersuchten Phenole teilweise ganz erhebliche Veränderungen des Spektrums der Kombinationslösung gegenüber den Einzelproben festgestellt werden (Tab.:5).

Tab.: 5 Auswertung der UV-Absorptionsspektren für die Reaktion zwischen sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon und Phenolen

Phenol	Bandenverschiebung von (nm)	nach (nm)	Intensitätsänderung Bande (nm)	Änderung (E)
(1) Phenol	---		---	
(2) p-Kresol	---		---	
(3) Hydrochinon	---		278	+ 0,025
(4) Brenzkatechin	---		277	+ 0,03
(5) Pyrogallol	335	285	355	- 0,09
			255	- 0,105
(6) Resorcin	275	290	275	+ 0,26
(7) Orcin	273/280	295	273	+ 0,24
(8) Phloroglucin	281	293	281	- 0,22

Bei der Analyse der Bandenverschiebung wurde von der Bandenlage in den Einzelproben bei Reaktionsende ausgegangen, denn diese Bandenlage sollte auch im Spektrum der Kombinationslösung vorliegen, wenn keine Wechselwirkung zwischen den sich bildenden Huminsäuren und den eingesetzten Phenolen stattgefunden hätte. Die Intensitätsänderung wurde durch Differenzbildung zwischen der Summe der Absorptionen der Einzelspektren und dem Kombinationsspektrum ermittelt. Der Vergleich erfolgte

an den Maxima der Einzelspektren. Eine weitergehende Auswertung konnte nicht erfolgen (wie z.B. die bei einigen Spektren vorhandenen Hinweise auf Elektronen - Donator - Akzeptor - Komplexe), da sie den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte.

Hervorstechend sind hier wieder besonders die m-substituierten Phenole. Die Kombinationslösungen mit Resorcin (Abb.6) bzw. Orcin (Abb.7) wiesen ein ganz erhebliches Zunehmen der Extinktion auf gegenüber der errechneten Summe der Einzelextinktionen.

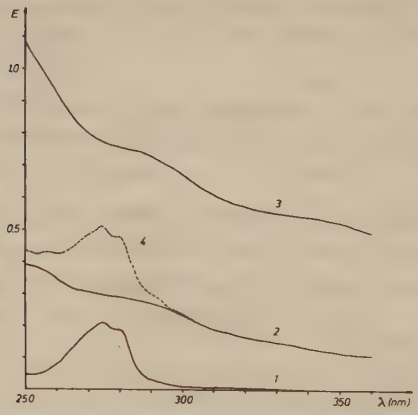


Abb.:6 Absorptionsspektrum der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Resorcin
(2) gebildete Modellhuminstoffe aus Hydrochinon
(3) Kombination aus Resorcin und den sich bildenden Modellhuminstoffen
(4) errechnete Summe der beiden Einzelabsorptionen von (1) und (2)

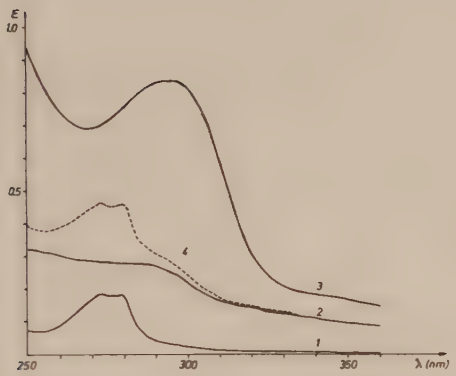


Abb.:7 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer 8,0

(1) oxydiertes Orcin
(2) gebildete Modellhuminstoffe aus Hydrochinon
(3) Kombination aus Orcin und den sich bildenden Modellhuminstoffen
(4) errechnete Summe der beiden Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Bei den Spektren der Kombinationslösung sind die scharfen Banden der Phenole nicht mehr vorhanden. In der Kombinationslösung hat vielmehr eine Vereinheitlichung der Spektren stattgefunden, so daß hier größere Ähnlichkeiten mit Huminstoffen festzustellen sind (wie auch bei der autoxydierten Hydrochinonlösung). Das in die Reaktionslösung eingebrachte Phenol (hier Resorcin bzw. Orcin) ist also weitgehend in die sich bildenden Huminstoffe miteingebaut und dann weiter oxydiert worden. Für das Resorcin und das Orcin ist somit ein gleiches Verhalten wie bei den Gaswechselmessungen festzustellen.

Das dritte m-substituierte Phenol, Phloroglucin, zeigt prinzipiell gleiches Verhalten, doch wird die Absorption des Phloroglucin während der Autoxydation ganz erheblich, etwa um den Faktor 2, vergrößert (Abb.8).

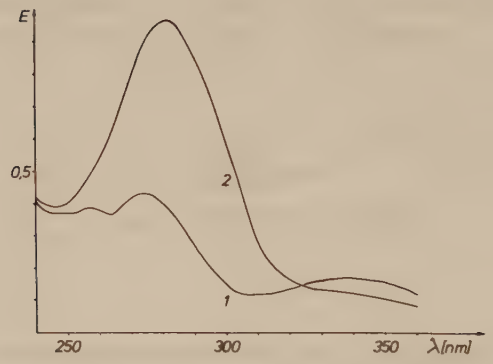


Abb.:8 Absorptionsspektren von Phloroglucin

(1) bei Beginn der Oxydation (t = 0 h)
(2) nach der Oxydation (t = 23 h)
jeweils in Puffer pH 8,0

Diese Extinktionserhöhung bedingt, daß das Summenspektrum aus den Einzelkomponenten im Maximum der Absorption des Phloroglucins das Spektrum der Kombinationslösung übersteigt (Abb.9).

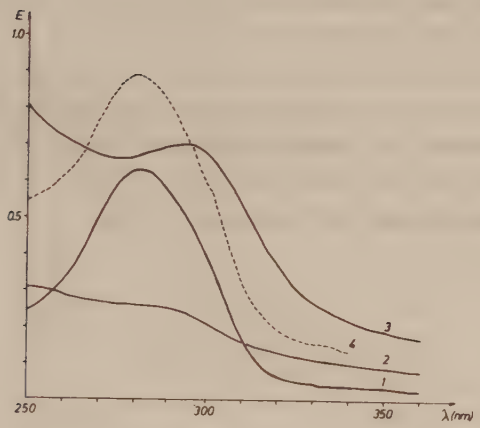


Abb.:9 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Phloroglucin
(2) gebildete Modellhuminstoffe aus Hydrochinon
(3) Kombination aus Phloroglucin und den sich bildenden Modellhuminstoffen
(4) errechnete Summe aus den beiden Einzelabsorptionen (1) und (2)

Je 20 nm zum kürzeren bzw. längeren Bereich bleibt das Summenspektrum dann deutlich unter dem Spektrum der Kombination.

Das Phloroglucin in der Kombinationslösung wird durch die sich bildenden Huminstoffe daran gehindert, eine gleiche Oxydation durchzumachen wie in der Einzelprobe. Diese "Behinderung" kann nur durch eine Bindung hervor-

gerufen werden. Die mit Ausnahme des Maximums bei 282 nm geringere Extinktion des Summenspektrums bestätigt ebenfalls das Ergebnis der Sauerstoffmehraufnahme bei den Gaswechselmessungen (3.2.1.). Es tritt also auch hier eine durch den Einbau des Phloroglucins verstärkte Reaktion zu den Huminstoffen hin ein.

Bei der Reaktion von Hydrochinon (Abb.10) und Pyrogallol (Abb.11) mit den sich bildenden synthetischen Huminstoffen können die Gaswechselmessungen durch die Elektronenspektren ebenfalls bestätigt werden:

Die Absorptionsspektren im UV-Bereich zeigen

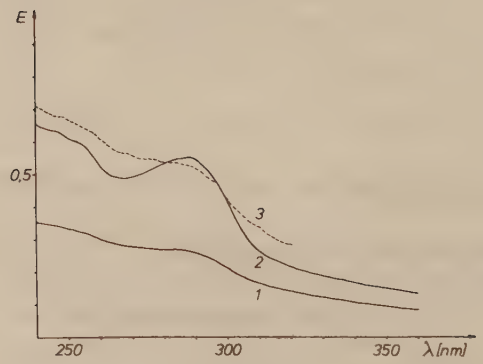


Abb.:10 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Hydrochinon
(2) oxydiertes Hydrochinon in doppelter Konzentration von (1) entspricht der Kombination
(3) aus (1) errechnete Absorption für die verdoppelte Hydrochinonmenge

jeweils eine geringere Absorption der Kombination gegenüber der Summe der entsprechenden Absorption der Einzelkomponenten, mit Ausnahme je eines Maximums, das bei den

Einzelkomponenten nicht vorhanden ist. Die Maxima um 290 nm

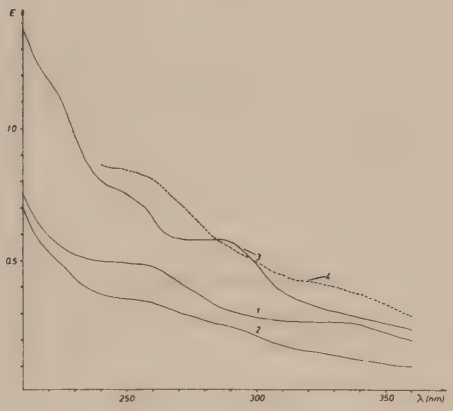


Abb.: 11 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Pyrogallol
(2) gebildete Modellhuminstoffe aus Hydrochinon
(3) Kombination aus Pyrogallol und den sich bildenden Modellhuminstoffen
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

stellen in der Kombinationslösung Reste des Ausgangsphenols dar.

Die Reaktion des Brenzkatechins mit den sich bildenden Huminstoffen zeigte bei der Gaswechselmessung eine deutliche

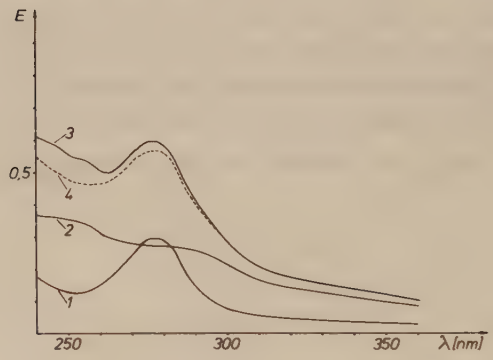


Abb.: 12 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Brenzkatechin
(2) gebildete Modellhuminstoffe aus Hydrochinon
(3) Kombination aus Brenzkatechin und den gebildeten Modellhuminstoffen
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Sauerstoffminderaufnahme der Kombinationslösung. Bei den Elektronenspektren (Abb.12) muß eine, wenn auch geringe Verstärkung der Absorption im UV-Bereich bei der Kombination festgestellt werden. Es kann also hier nur das Stattfinden einer Wechselwirkung des Brenzkatechins mit dem sich bildenden Huminstoff festgestellt werden. Eine eindeutige Zuordnung des Unterschieds in der Absorption kann hier nicht vorgenommen werden.

3.2.3. Infrarotspektren

Die IR - Spektroskopie stellt als zweites hier verwendetes spektroskopisches Verfahren eine weitere gute Möglichkeit dar, die Wechselwirkungen der ausgewählten Phenole mit den Huminstoffen in statu nascendi zu charakterisieren.

Diese analytische Methode, die im allgemeinen zur Strukturaufklärung herangezogen wird, kann solches hier natürlich nicht leisten, da die Huminstoffe und ganz besonders die sich bildenden Huminstoffe Stoffgemische darstellen, die sowohl in ihren Bausteinen als auch in der Verknüpfungsform uneinheitlich sind. Wenn also die IR-Spektroskopie hier als Meßmethode herangezogen wird, so nur unter einem vergleichenden Aspekt. Es werden jeweils die Einzelproben der Phenole und der gebildeten synthetischen Huminstoffe vermessen und mögliche Unterschiede zum Spektrum der Kombination aufgezeigt. Dieser Vergleich war nur möglich, da eine gleiche präparative Aufbereitung der Proben erfolgte.

(Der bei 40°C gewonnene Abdampfrückstand von je 0,2 ml Reaktionslösung wurde mit 300 mg KBr vermischt und in der Vibrationsmühle homogenisiert. Das Pressen der Probe erfolgte bei 10 Kp / cm^2.)

Zu beachten bleibt, daß die Proben mit den Abdampfrückständen des Puffers vermischt sind. Da es sich aber nur um HPO_4^{--} und $H_2PO_4^-$ -Ionen handelt, können die dazugehörigen Banden im IR-Spektrum gut lokalisiert werden.

So weist HPO_4^{--} eine Bande bei 1050 bis 1090 cm^{-1} auf und $H_2PO_4^-$ absorbiert bei 1030 bis 1090 cm^{-1}. Beide Ionen zeigen eine geringe Absorption im Gebiet 900 bis 1000 cm^{-1} (BELLAMY, 1966).

Für das Phenol kann, wie auch schon bei der Absorption im UV-Bereich, keine Abweichung der Kombinationsprobe von den Einzelproben festgestellt werden, d.h. alle Banden des Spektrums des Phenols nach der Reaktion und

ebenfalls die Banden des Spektrums der gebildeten synthetischen Huminstoffe sind im Spektrum der Kombination enthalten. Für das Phenol bedeutet das, daß zwar eine Wechselwirkung mit den sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon stattfindet, diese aber nur anhand der verminderten Sauerstoffaufnahme der Kombination gegenüber den Einzelkomponenten nachgewiesen werden kann.

Für die übrigen eingesetzten Phenole kann aus der Tab.6 ein Überblick über die Ergebnisse der IR-Spektren gewonnen werden.

Tab.: 6 Auswertung der IR-Spektren für die Reaktionen zwischen sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon und Phenolen

Probe	neue Bande in der Kombination (cm^{-1})	Banden der Einzelproben (gebildete Huminstoffe, oxydierte Phenole), die in der Kombination nicht auftreten (cm^{-1})
Phenol	---	---
p-Kresol	1120	---
Hydrochinon	1470 1245 830 760	---
Brenzkatechin	---	---
Pyrogallol	1515 1470 1245 1215 1095 830 760	---
Resorcin	---	1490 1300 775 685 460
Orcin	1785	1480 1305, 1335 stark verbreitert 1030 970
Phloroglucin	---	---

Das p-Kresol weist in der Kombination bei 1120 cm^{-1} eine sehr schwache neue Bande auf, die den 1,4 substituierten Aromaten zugeordnet werden kann.

Auf strukturelle Veränderungen kann aus dem Neuauftreten dieser Bande natürlich nicht geschlossen werden, doch könnte die Zuordnung zu 1,4 Aromaten die Vermutung zulassen, daß die Absorption durch Hydrochinonteilchen hervorgerufen wird.

Ist Hydrochinon der Reaktionspartner der sich bildenden Huminstoffe, so treten in der Kombination eine ganze Reihe von Banden auf, die bei den Einzelkomponenten nicht mehr vorhanden sind.

Die Banden bei 1470, 1245 und 830 cm^{-1} sind eindeutig den 1,4 di-substituierten Aromaten zuzuordnen, so daß das Ergebnis der Gaswechselmessung, die Sauerstoffminderaufnahme der Kombination, durch die IR-Spektroskopie eine Bestätigung erfährt. In der Kombinationslösung sind, verglichen mit den Einzelkomponenten, mehr solche Teilchen vorhanden, die noch dem Ausgangsprodukt Hydrochinon ähnlich sind.

Die Kombination von Brenzkatechin und den sich bildenden Huminstoffen zeigt ein Spektrum, das der Summe der Einzelkomponenten entspricht. Bei der Kombination ist lediglich eine gewisse Verbreiterung und Verkürzung der Banden festzustellen.

Das Pyrogallol zeigt als Einzelprobe im IR-Spektrum nach der Oxydation schon eine relativ starke Näherung an die Huminstoffe (breite, wenig scharfe Banden), wohingegen dann bei der Kombination eine Reihe von Banden des Pyrogallols noch ausgeprägt vorhanden sind.

Die Banden bei 1550, 1470, 1095, 830 und 760 cm^{-1} weisen zusammen deutlich auf das Vorhandensein von 1,2,3-tri-substituierten Aromaten hin, also solchen des Pyrogalloltyps. Die Banden bei 1245 und 1215 cm^{-1} zeigen 1,4 substituierte Aromaten an. Es sind also, und das ist

eine Bestätigung der Gaswechselmessungen und der Elektronenspektren, noch erhebliche Anteile der Ausgangsphenole vorhanden.

Auch beim Resorcin werden erhebliche Unterschiede zwischen den drei Spektren deutlich.

Banden, die bei der Probe "Resorcin" noch vorhanden sind, treten im Kombinationsspektrum nicht mehr auf:
so 1490, 1300, 775, 685 und 460 cm^{-1}.

Das Kombinationsspektrum verläuft also erheblich monotoner als die Spektren der Einzelkomponenten, was auf eine weitergehende Autoxydation bei der Kombination in Richtung auf die Huminstoffe hindeutet.

Ein gleiches Bild ist auch für das Orcin vorzufinden. Banden, die bei der Einzelprobe Orcin deutlich erkennbar sind (1480, 1030, 970, 685 cm^{-1}), treten in der Kombination nicht mehr auf.

Bei den Banden 1305 und 1335 cm^{-1} hat darüber hinaus noch eine erhebliche Verbreiterung stattgefunden.

Für den Ansatz des Phloroglucins mit den sich bildenden Huminstoffen gilt prinzipiell Gleiches, doch ist hier nur eine allgemeine Verbreiterung der Banden bei der Kombinationsprobe festzustellen.

Für die m-Phenole der hier ausgewählten Reihe gilt also auch bezüglich der IR-Spektren - die Gaswechselmessungen und die UV-Spektren hatten es schon gezeigt -, daß die Kombinationen "huminstoffähnlicher" sind, in der Oxydation also weiter fortgeschritten.

Für die Monohydroxyphenole und die in ortho- und para-Stellung substituierten Dihydroxyphenole werden durch die IR-spektroskopische Untersuchung ebenfalls die Ergebnisse der Gaswechselmessungen und der UV-Spektroskopie bestätigt: Bei den Einzelkomponenten, besonders bei den sich bildenden Huminstoffen, geht die Humifizierung schneller vonstatten als bei deren Mischung in der Kombination.

3.3. Wechselwirkung zwischen Phenolen und Modellhuminsäuren

Nach der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Phenolen und den Huminstoffen während ihrer Bildung (siehe 3.2.) ist natürlich von allergrößtem Interesse, ob und wie die Phenole mit solchen Huminstoffen reagieren, deren Bildung an sich schon weitgehend abgeschlossen ist.

Die eingesetzten Huminsäuren stellen den säurefällbaren Anteil einer alkalischen Autoxydationslösung von Hydrochinon dar. Diese Modellsubstanz wurde schon häufig für die Untersuchung der Huminstoffe herangezogen und ist in der Literatur ausgiebig beschrieben (ZIECHMANN, PAWELKE, 1959; SCHEFFER, WELTE, ZIECHMANN, 1955).
Die Huminsäure ist durch das Ausfällen und anschließende gründliche Dialysieren von niedermolekularen Teilchen befreit. Es können sowohl chromatographisch als auch spektroskopisch (einschließlich der Fluoreszenz) keine Ausgangssubstanzen mehr nachgewiesen werden. Da die Huminsäure im weiteren äußerst vorsichtig behandelt wurde, blieb ihre Reaktionsfähigkeit weitestgehend erhalten.

Ein erstes Aufzeigen der Wechselwirkungen kann auch hier wieder anhand der Messung der Gaswechselmengen vorgenommen werden.

3.3.1. Gaswechselmessungen

Die Gaswechselmessungen wurden wieder in der Warburg-Apparatur durchgeführt (siehe auch 3.2.1.). Die Füllmenge der Reaktionsgefäße betrug 3 ml. Als Medium wurde wieder Phosphatpuffer pH 8,0 nach Soerensen eingesetzt. Die Einwaage an Modellhuminsäuren betrug je 10 mg auf 3 ml Reaktionslösung. Die Konzentration der eingesetzten Phenole war unverändert 0,0125 m. Die Schüttelfrequenz (70 min^{-1})und die Reaktionstemperatur (303 K) wurden ebenfalls beibehalten.

Bei der Durchführung dieses Versuchs wurde der größte Anteil der Sauerstoffaufnahme im allgemeinen durch die Autoxydation der Phenole bedingt. Eine Änderung dieser Gasaufnahme durch das Hinzufügen der Huminsäure, deren eigene Sauerstoffabsorption natürlich berücksichtigt wurde, ließ dann auf eine Reaktion der Phenole mit der Huminsäure schließen.

Da die hier benutzten Modellhuminstoffe einen ausgeprägt sauren Charakter aufwiesen - sie ergaben in der verwendeten Konzentration in Wasser einen pH-Wert von 2,9 -, wurden sie durch Titration mit NaOH in das Natriumsalz überführt. Es konnte so sichergestellt werden, daß in der Kombinationslösung keine auch noch so geringe pH-Wertverschiebung eintrat, die eine Veränderung der Sauerstoffaufnahme der Phenole hätte bewirken können.

Die um die Schwankungen des Thermobarometers bereinigten Sauerstoffwechselmengen der Einzelkomponenten und der Kombinationslösung werden, wie hier am Beispiel der Reaktion von Hydrochinon mit der Huminsäure gezeigt ist, gegen die Zeit aufgetragen (Abb.13).

Charakterisierend für den "Effekt" ist wieder die Differenz zwischen der Summe der Sauerstoffaufnahme der Einzelkomponenten (4) und der O_2 - Aufnahme der Kombination (3). Diese Differenzen werden dann als ΔO_2 gegen die Reaktionszeit aufgetragen (siehe Abb.14). Die für die einzelnen Versuche notwendigen Reaktionszeiten sind sehr unterschiedlich, da sie von der Geschwindigkeit abhängen, mit der die Sauerstoffaufnahme bzw. -abgabe bei den einzelnen Phenolen vonstatten geht.

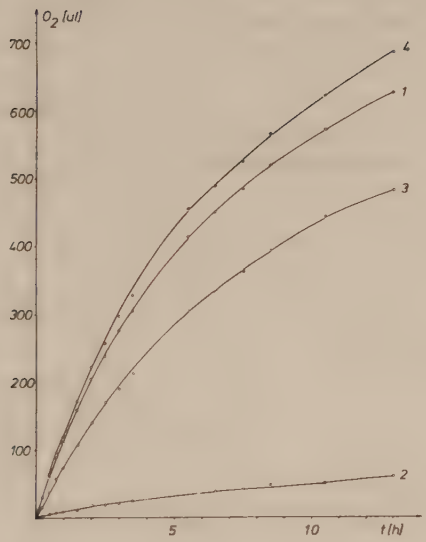


Abb.: 13 Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Wechselwirkung zwischen Modellhuminsäuren und Hydrochinon in Puffer pH 8,0

(1) Sauerstoffaufnahme des Hydrochinons (0,0125 m)
(2) Sauerstoffaufnahme der Modellhuminsäure (10 mg / 3 ml)
(3) Sauerstoffaufnahme der Kombination aus Hydrochinon (0,0125 m) und Modellhuminsäure (10 mg / 3 ml)
(4) errechnete Summe der Einzelsauerstoffaufnahmen der Komponenten (1) und (2)

Die Abb.14 und 15 zeigen die Differenzkurven für die Sauerstoffwechselversuche der eingesetzten Phenole mit der Huminsäure. Der Versuch mit Phenol als Reaktionspartner der Huminsäure wurde nicht dargestellt, da eine abzusichernde Differenz nicht zu ermitteln war.

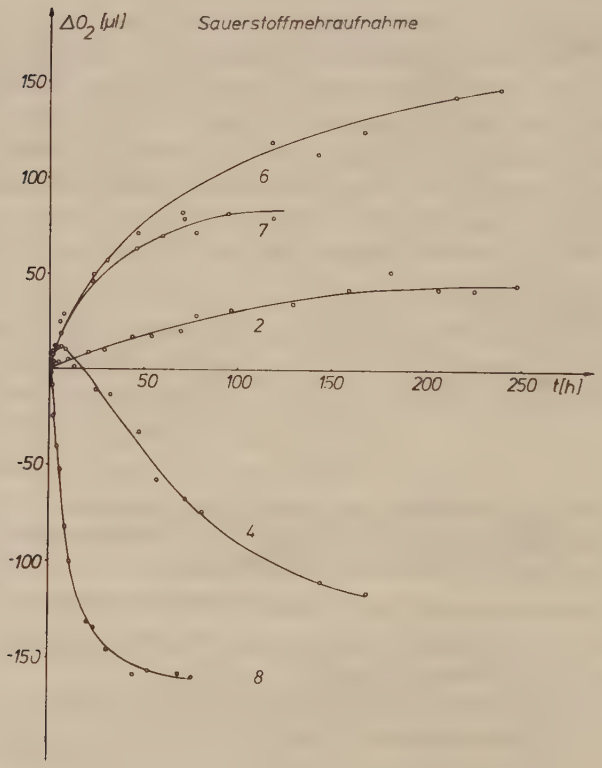


Abb.: 14 Verlauf der Sauerstoffaufnahmedifferenzen aus den Kombinationen und den Summen der Einzelkomponenten der Reaktionen zwischen den Modellhuminsäuren (10 mg/3ml) und den angegebenen Phenolen (0,0125 m)

(2) p-Kresol
(4) Brenzkatechin
(6) Resorcin
(7) Orcin
(8) Phloroglucin

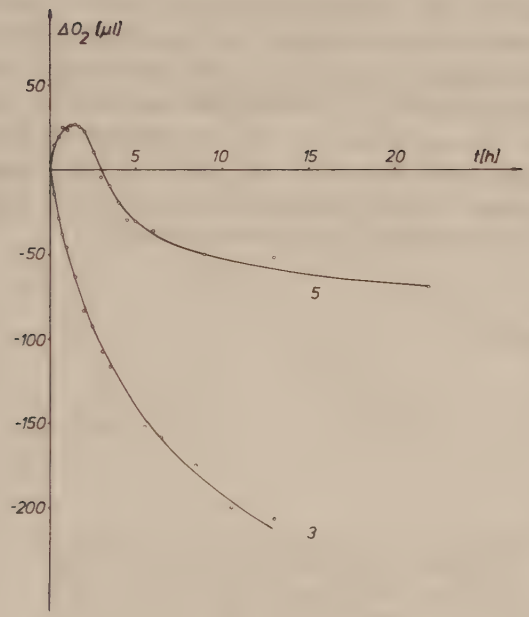


Abb.: 15 Verlauf der Sauerstoffaufnahmedifferenzen aus den Kombinationen und den Summen der Einzelkomponenten der Reaktionen zwischen der Modellhuminsäure (10 mg/3 ml) und den angegebenen Phenolen (0,0125 m)

(3) Hydrochinon
(5) Pyrogallol

Schon aus diesen Darstellungen sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Phenolen abzulesen.
So wird beim p-Kresol, Resorcin und Orcin die Sauerstoffaufnahme durch die Anwesenheit der Huminsäuren deutlich erhöht, beim Hydrochinon, Brenzkatechin, Pyrogallol und Phloroglucin hingegen zeigt sich eine Abnahme der Sauerstoffabsorption der Kombinationslösung gegenüber der Summe der Einzelkomponenten.

Besonders für die Phenole, bei denen der Gaswechsel relativ langsam abläuft, ist die schon unter 3.2.1. aufgezeigte Darstellungsform der jeweils reziproken Werte der Sauerstoffaufnahmedifferenzen gegen die reziproke Reaktionsdauer von Bedeutung, da hier mit sehr guter Genauigkeit auf die Werte für $t = \infty$ extrapoliert werden kann ($^1/_{\Delta O_2}$ für $1/t = 0$ dh.: $t = \infty$). Ein Vergleich der Sauerstoffaufnahmedifferenzen sollte am besten anhand dieser O_2 max.-Werte erfolgen, da so für alle Phenole gleiche Voraussetzungen geschaffen werden.

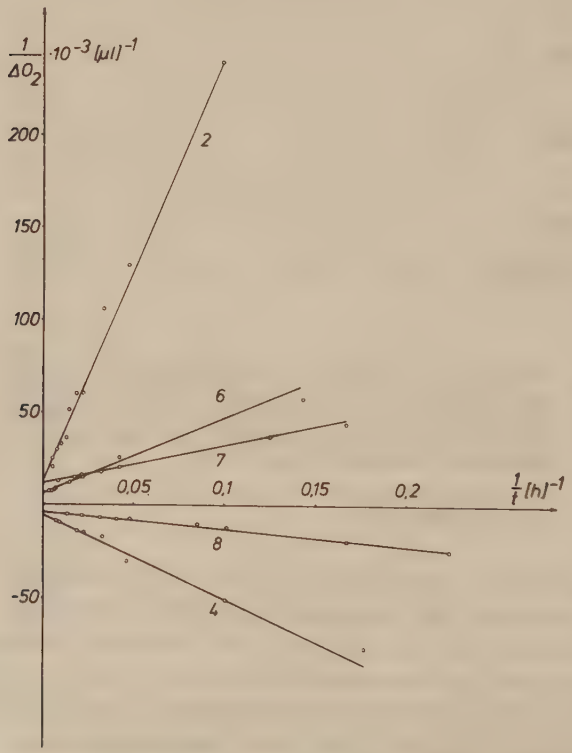


Abb.:16 Verlauf der Sauerstoffaufnahmedifferenz aus den Kombinationen und den Summen der Einzelkomponenten der Reaktionen zwischen der Modellhuminsäure und den angegebenen Phenolen in reziproker Auftragung

(2) p-Kresol
(4) Brenzkatechin
(6) Resorcin
(7) Orcin
(8) Phloroglucin

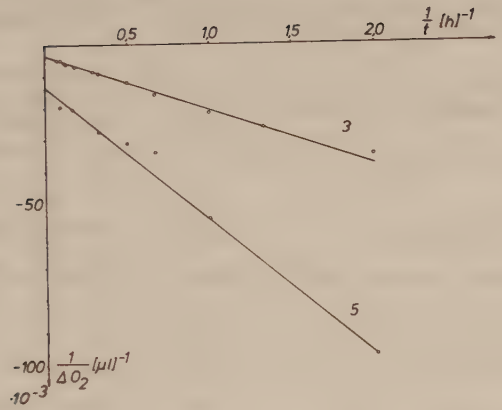


Abb.: 17 Verlauf der Sauerstoffaufnahmedifferenzen aus den Kombinationen und den Summen der Einzelkomponenten der Reaktionen zwischen dem Modellhuminsäuren und den angegebenen Phenolen in reziproker Auftragung

(3) Hydrochinon
(5) Pyrogallol

Die für die Reaktion des Brenzkatechin (4) und des Pyrogallol (5) mit den Huminstoffen ermittelten Differenzkurven (Abb.14/15) weisen ein Maximum bei t= 5h bzw. t = 1,5 h auf. Es ist daher nicht ohne weiteres möglich, diese Kurven mit den Reziprokkoordinaten darzustellen. Um aber einen ungefähren Vergleich zu ermöglichen, wurden die Geraden mit den Koordinaten $1/\Delta O_2$ und 1/t jeweils nur für den Kurvenabschnitt erstellt, der ohne Maximum verläuft und die Abszisse nicht mehr schneidet (für das Brenzkatechin ab t = 10 h; für Pyrogallol ab t = 3 h).

Aus den Abb. 16 und 17 lassen sich folgende Geradengleichungen und Werte für die maximale Sauerstoffmehr- bzw.-minderaufnahme ermitteln:

Tab.: 7 Maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz für die Reaktion der Modellhuminsäure mit den Phenolen

Phenole	Geradengleichung	$\Delta O_2 max$ (μl)	Art des Gaswechsels
(1) Phenol	---	---	---
(2) p-Kresol	y=2,25x+o,o13	+ 77	Mehraufnahme
(3) Hydrochinon	y=o,1675x-o,oo35	-263	Minderaufnahme
(4) Brenzkatechin	y=o,455x-o,oo6	-167	"
(5) Pyrogallol	y=o,o41x-o,o13	- 76	"
(6) Resorcin	y=o,4ox+o,oo6	+167	Mehraufnahme
(7) Orcin	y=o,195x+o,o115	+ 87	Mehraufnahme
(8) Phloroglucin	y=o,o9ox-o,oo45	-220	Minderaufnahme

Um die quantitativen Verhältnisse dieser Wechselwirkung zwischen den Phenolen und der Modellhuminsäure zu untersuchen, wurden weitere Gaswechselmessungen in der Warburg-Apparatur durchgeführt.

Eine Relation zwischen Sauerstoffaufnahme und eingesetzter Phenolkonzentration ließ sich herleiten, nachdem Hydrochinon in einer Konzentrationsreihe hinsichtlich der nun abgestuften Sauerstoffaufnahmen vermessen wurde. Die Auftragung der jeweils reziproken Werte (Abb.18) ermöglicht es, die maximale Sauerstoffaufnahme der einzelnen Lösungen zu ermitteln:

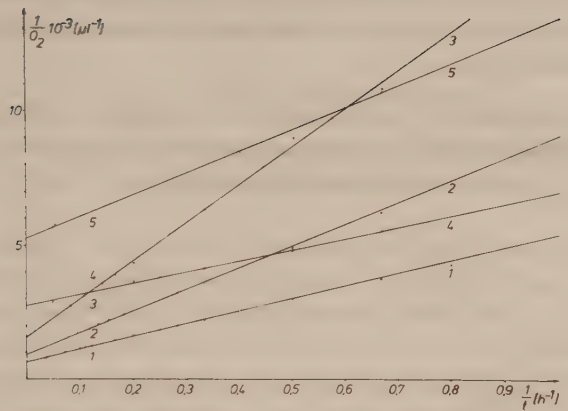


Abb.: 18 Verlauf der Sauerstoffaufnahme unterschiedlicher Hydrochinonkonzentrationen in Puffer pH 8,o

(1) 0,025 m
(2) 0,0125 m
(3) 0,00625 m
(4) 0,00313 m
(5) o,00156 m

Tab.: 9 Maximale Sauerstoffaufnahme unterschiedlicher Hydrochinonkonzentrationen

Hydrochinon-Konzentration (m)	maximale Sauerstoffaufnahme O_2 max (µl)
0,025	1600
0,0125	1050
0,00625	645
0,00313	364
0,00156	190

Die Ermittlung der maximalen Sauerstoffaufnahme ist notwendig, um die Zeitabhängigkeit der Reaktion des Hydrochinons mit dem Sauerstoff zu eliminieren, da sich auch hier unterschiedliche Konzentrationen unterschiedlich verhalten.

Aus den Werten der Tab.9 kann eine Eichkurve für die Sauerstoffaufnahme des Hydrochinons in Abhängigkeit von der Konzentration erstellt werden.

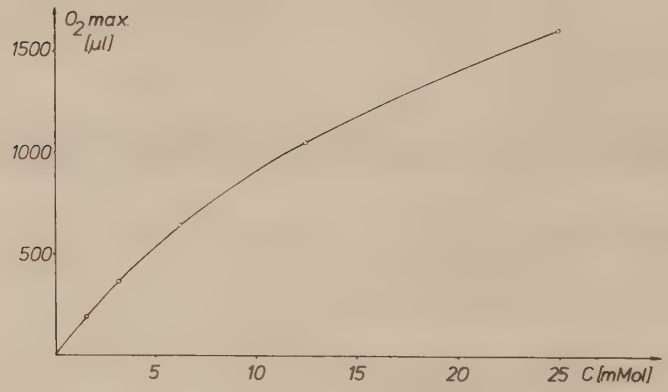


Abb.: 19 Die maximale Sauerstoffaufnahme unterschiedlicher Hydrochinonkonzentrationen (Eichkurve)

Anhand dieser Kurve ist es jetzt möglich, durch die maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz (Tab.7) die Konzentration an Hydrochinon zu ermitteln, die durch die "Wechselwirkung" mit der Huminsäure nicht der Autoxydation unterworfen wurde:

O_2 max = 263 µl $\hat{=}$ 0,00215 m Hydrochinon.

Es werden also 17,2% der eingesetzten Hydrochinonmenge in der Kombinationslösung nicht oxydiert.

Weiter konnte jetzt geprüft werden, wie sich der Einfluß wechselnder Hydrochinonmengen auf die Reaktion mit der Huminsäure darstellt. Hydrochinon reagierte in drei verschiedenen Konzentrationen mit je 10 mg der Modellhuminsäuren. Die maximale Sauerstoffminderaufnahme der Kombinationslösung wurde wieder durch Extrapolation auf eine unendliche Reaktionszeit aus der Darstellung der reziproken Sauerstoffaufnahmedifferenzen gegen die reziproke Reaktionszeit ermittelt. Die Tab.10 gibt die Ergebnisse wieder.

Tab.:10 Maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz und Konzentration des gebundenen Hydrochinons für die Reaktionen zwischen Hydrochinon und Huminsäure in verschiedenen Mengenverhältnissen

Nr.	Konzentration des Hydrochinons (m)	Konz.der Huminsäure (mg/3ml)	ΔO_2max (µl)	Konz.des gebundenen Hydrochinon (m)	Faktor +)
1	0,00625	10	170	0,00135	1
2	0,0125	10	263	0,00215	1.59
3	0,025	10	317	0,00265	1,96
4	0,0125	5	127	0,0010	1
5	0,0125	10	263	0,00215	2,15
6	0,0125	20	445	0,0040	4,0

+) Der Faktor wird auf die Konzentration des gebundenen Hydrochinons bezogen und zwar für Nr.1-3 auf 1 und für 4-6 auf 4.

Neben dem Hydrochinon als Variabler (Tab.10 Nr.1-3) war auch die Änderung der Sauerstoffminderaufnahme der Kombination bei unterschiedlicher Huminstoffkonzentration von Interesse (Tab.10 Nr.4-6), wobei die Ergebnisse auf die gleiche Art gewonnen wurden wie bei den unterschiedlichen Hydrochinonkonzentrationen.

3.3.2. Elektronenspektren

Bei den Elektronenspektren sind, verglichen mit der Reaktion der Phenole mit den sich bildenden Huminstoffen (siehe 3.2.2.), natürlich erheblich geringere Veränderungen zu erwarten. Dennoch treten in einigen Fällen auch deutliche Abweichungen des Kombinationsspektrums gegenüber den errechneten Summenspektren der Einzelkomponenten auf. Die Abweichungen werden eher sichtbar, da die eine Komponente der Reaktion, die Modellhuminstoffe, ein Elektronenspektrum aufweist, das monoton nach größerer Wellenlänge hin abfällt.

Kriterien des Vergleichs waren wieder Bandenverschiebungen und Intensitätsunterschiede im Spektrum der Kombinationslösung gegenüber dem Summenspektrum der Einzelkomponenten. Dieser Vergleich war möglich, da die Untersuchungen mit den Produkten aus den Warburg-Versuchen durchgeführt wurden und diese genau beschreibbare Konzentrationen der Reaktionspartner enthielten. Einen ersten Überblick über die Ergebnisse liefert Tab.11.

Daß bei der Reaktionslösung aus Modellhuminsäure und Phenol keine Veränderung der Kombinationslösung im UV-Spektrum aufzufinden ist, war zu erwarten, da auch bei den Gaswechselmessungen die Sauerstoffaufnahme der Kombinationslösung der O_2-Absorption der Summe der Einzelkomponenten vollständig entsprach. Diese Übereinstimmung zeigt also auch, daß der hier gewählte analytische

Ansatz den vorliegenden Sachverhalt richtig zu erfassen vermag.

Tab.: 11 Auswertung der UV-Absorptionsspektren der Produkte der Reaktionen zwischen Modellhuminsäure und Phenolen

Nr.	Phenol	Bandenverschiebung von (nm)	nach (nm)	Intensitätsänderung Bande (nm)	Änderung (E)
1	Phenol	---	---	---	---
2	p-Kresol	---	---	275	+ 0,05
3	Hydrochinon	---	---	254	+ 0,05
				285	+ 0,04
4	Brenzkatechin	280	276	280	- 0,05
5	Pyrogallol	---	---	260	- 0,09
6	Resorcin	---	---	274	- 0,08
7	Orcin	---	---	272	- 0,15
8	Phloroglucin	279	271	279	- 0,03

Die Reaktion des p-Kresols mit der Modellhuminsäure (Abb.20) ist mit einer Erhöhung des Kombinationsspektrums gegenüber der Summe der Einzelkomponenten verbunden,und zwar nicht nur im Bereich der maximalen Absorption, des p-Kresols, sondern auch zwischen 240 und 270 nm, während im längerwelligen, nach 275 nm,die Absorptionsdifferenz sehr schnell abnimmt.

Die Absorptionszunahme im kurzwelligen Bereich weist nicht nur deutlich eine Wechselwirkung zwischen dem Phenol und der Modellhuminsäure aus, sondern zeigt auch, daß die absorbierenden Teilchen in der Kombination weiter oxydiert sind als in der Einzelprobe.

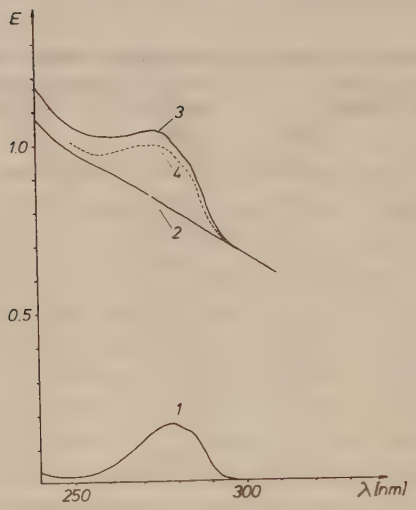


Abb.:20 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes p-Kresol
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus p-Kresol und Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Auch die UV-Spektren der Reaktionslösung der Oxydation des Hydrochinons in Gegenwart der Modellhuminsäuren (Abb.21) zeigen die Abweichung der Summe der Einzelkomponenten von der Kombinationslösung. Hier ist aber die Erhöhung der Absorption des Summenspektrums verbunden mit einer Sauerstoffminderaufnahme der Kombination, also mit einer geringeren sauerstoffabhängigen Veränderung des Hydrochinons. Im UV-Spektrum spricht

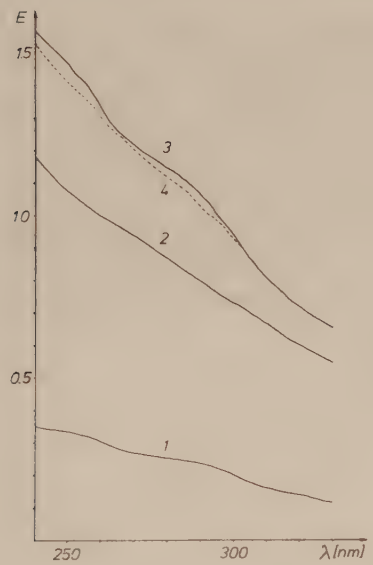


Abb.: 21 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Hydrochinon
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Hydrochinon und Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

für diese Reaktionsverminderung die leicht erhöhte Absorption um 285 nm, die Stelle der maximalen Absorption des Hydrochinons. Ebenfalls schlägt sich die geringere Absorption der Kombination zwischen 300 und 360 nm, wo sich die Absorptionserhöhung von "humifiziertem" Hydrochinon bemerkbar macht (also stärker unter O_2-Aufnahme oxydiertem Hydrochinon), im Summenspektrum der Einzelproben nieder.

Für die Ergebnisse der untersuchten Reaktion von Brenzkatechin mit Modellhuminsäuren ist die Interpretation eindeutig. Die Reaktionslösung der Kombination (Abb.22)

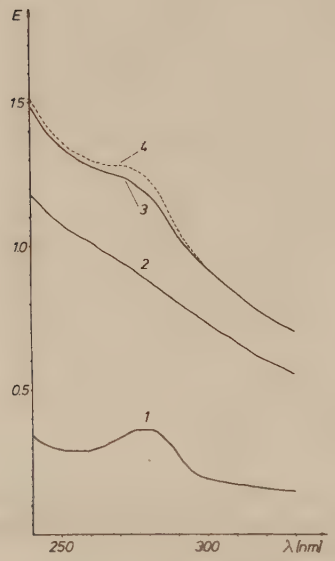


Abb.: 22 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Brenzkatechin
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Brenzkatechin und der Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

weist weniger Brenzkatechin auf, als es die Summe der Einzelspektren anzeigt. Dieser Anteil von Brenzkatechin ist spektroskopisch nicht mehr aktiv, d.h., er ist eine relativ feste Wechselwirkung mit den Modellhuminstoffen eingegangen. Bei den Modellhuminstoffen ist

eine Änderung des Spektrums durch eine solche "Wechselwirkung" nicht zu erwarten, da sie schon über eine Vielzahl ähnlich strukturierter Molekülteile verfügen.

Zwischen 240 und 290 nm weist das Elektronenspektrum der Kombinationslösung aus Pyrogallol und Modellhuminsäure eine geringere Absorption als das Summenspektrum der Einzelkomponenten auf (Abb.23). Es zeigt sich so, daß der Kombinationslösung Pyrogallol entzogen wurde oder besser, für die Absorption in diesem Bereich nicht mehr zur Verfügung steht. Hier ist ein Effekt zu beobachten, wie er auch bei der Reaktion von Modellhuminsäuren mit Brenzkatechin anzutreffen ist.

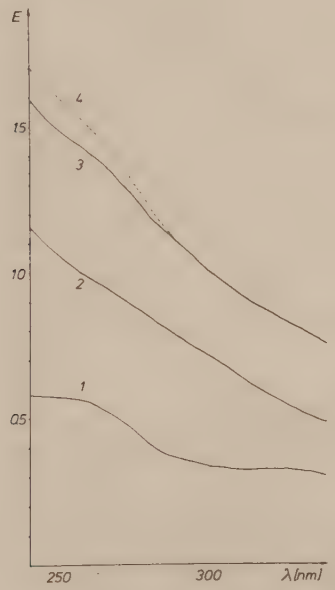


Abb.:23 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Pyrogallol
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Pyrogallol und Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Die spektroskopischen Aufnahmen des Versuchs, in dem Resorcin mit den Modellhuminsäuren reagiert, weisen zwischen 260 und 282 nm eine deutlich geringere Absorption des Kombinationsspektrums als die Summe der Einzelkomponenten auf (Abb.24), was auch hier wieder auf eine geringere Menge von Resorcin in der Kombinationsprobe zurückzuführen ist. Daß darüber hinaus auch noch in der Kombination das Resorcin weiter oxydiert ist als das der Einzelprobe, ist daran zu erkennen, daß das Summenspektrum unterhalb 260 nm und oberhalb 282 nm eine geringere Absorption aufweist als die Kombination.

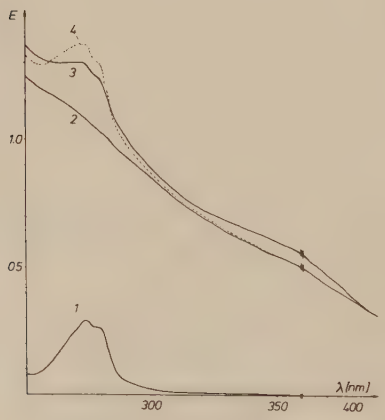


Abb.:24 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Resorcin
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Resorcin und der Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Auch für das Orcin, das ebenfalls im UV-Spektrum deutlich sichtbare Wechselwirkungen mit der Huminsäure eingeht, kann festgestellt werden, daß - wie beim Resorcin - in der Kombinationslösung weniger freies Phenol vorhanden ist als in der Einzelprobe: das Maximum des Summenspektrums liegt deutlich über dem der Kombination.

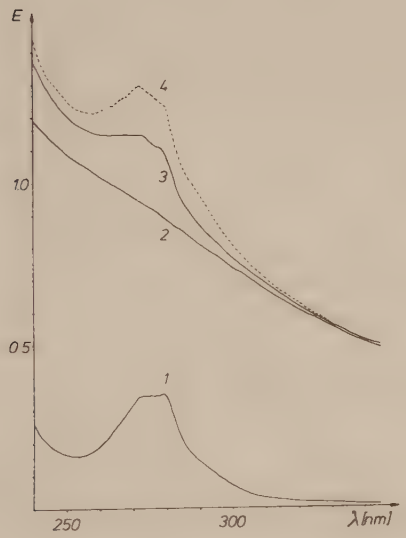


Abb.: 25 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Orcin
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Orcin und der Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Das dritte m-substituierte Phenol, das Phloroglucin, weist eine geringere Absorption der Kombinationslösung gegenüber dem Summenspektrum der Einzelkomponenten auf (Abb.26).

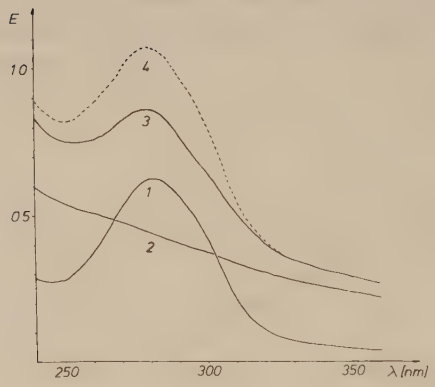


Abb.:26 Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Phloroglucin
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Phloroglucin und der Modellhuminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von (1) und (2)

Diese starke Verminderung zeigt an, daß die stattfindende Wechselwirkung des Phloroglucin in quantitativer Hinsicht sehr intensiv ist. Der unter 3.2.2. (Abb.8) zu beachtende Aspekt der Absorptionszunahme des Phloroglucins während der Oxydation ist hier nicht von Bedeutung, da das Summenspektrum von 325 nm an mit dem

Kombinationsspektrum gleich verläuft. Wäre die geringere Absorption hier auf den unterschiedlichen Oxydationsgrad des Phloroglucins zurückzuführen, so hätte das Summenspektrum von ca 325 nm an deutlich unter dem Kombinationsspektrum verlaufen müssen, da das geringer oxydierte Phloroglucin zwischen 325 und 360 nm eine höhere Absorption aufweist als das unter den hier herrschenden Bedingungen oxydierte. Die geringere Absorption des Kombinationsspektrums ist also ausschließlich darauf zurückzuführen, daß ein Anteil des Phloroglucins von den Huminsäuren so in eine Wechselwirkung verstrickt wurde, daß die Moleküle sich nicht mehr an der Absorption im ultravioletten Bereich beteiligen können.

3.3.3. Infrarotspektren

Die Proben für die IR-Spektren wurden wieder aus der Reaktionslösung der Warburg-Versuche gewonnen, sind also auch hier mit den HPO_4^{--} - und $H_2PO_4^-$ -Ionen des Puffers versetzt. Die diesen Ionen zuzuordnenden Banden müssen daher für die Interpretation der Spektren außer acht gelassen werden. Die Proben wurden zu KBr-Preßlingen aufbereitet (der Abdampfrückstand von 0,2 ml Reaktionslösung wurde mit 300 mg KBr vermischt und in der Vibrationsmühle homogenisiert), wobei auf exakte Gleichbehandlung der Proben innerhalb jeder Gruppe geachtet wurde. Es ist so möglich, die einzelnen Spektren einer Gruppe zu vergleichen und etwaige Unterschiede zu erfassen.

Die Tab.13 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des Vergleichs der Spektren der Einzelkomponenten mit dem Kombinationsspektrum.

Für Phenol und p-Kresol waren keine Differenzen zu ermitteln. Da aber eine Veränderung im IR-Spektrum erst festgestellt werden kann, wenn sie ca 5% ausmacht,

können bei diesen beiden Ansätzen durchaus noch Veränderungen stattgefunden haben.

Tab.: 13 Auswertung der IR-Spektren der Produkte der Reaktion zwischen Modellhuminsäuren und Phenolen

Phenol	neue Bande in der Kombination (cm^{-1})	Bandenverschiebung von nach (cm^{-1})	Banden der Einzelproben, die in der Kombination nicht mehr auftreten (cm^{-1})
Phenol	---	--- ---	---
p-Kresol	---	--- ---	---
Hydrochinon	830	--- ---	---
	765		
Brenzkatechin	---	--- ---	1515
Pyrogallol	---	1635 1605	---
Resorcin	---	1635 1605	1490
			1310
			1295
			775
			740
Orcin	---	1630 1605	1710
			1510
			1480
			1260
			1135
			1120
			825
			765
			615
Phloroglucin	---	--- ---	---

Bei der Reaktion des Hydrochinons mit der Huminsäure ist nur im Spektrum der Kombination die Bande bei 830 cm^{-1} vorhanden, hingegen nicht bei der Huminsäure und auch nicht im Spektrum des oxydierten Hydrochinons.

Diese Bande wird auf 1,4 substituierte Aromaten zurückgeführt, also solche des Hydrochinontyps (BELLAMY,1966). Die bei 765 cm^{-1} auftretende kleine Bande ist ebenfalls dem Hydrochinon zuzuordnen (MECKE). Auch sie konnte im Kombinationszentrum nicht festgestellt werden. Offensichtlich ist die Ähnlichkeit der Spektren des autoxydierten Hydrochinons und des Modellhuminstoffs. Es ist daher besonders bemerkenswert, daß im IR-Spektrum der Kombination beider Substanzen neue Banden auftreten.

Das Kombinationsspektrum aus Brenzkatechin und Huminsäure zeichnet sich durch das Fehlen einer Bande aus, die im Einzelspektrum des Brenzkatechins bei 1515 cm^{-1} als -C = C - Ringschwingung vorhanden ist.
Andere Banden des Brenzkatechinspektrums überlappen sich im Kombinationsspektrum mit den Banden der Huminsäuren, so daß eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Die Spektren des oxydierten Pyrogallol, der Huminsäure und der Kombination nach der Reaktion unterscheiden sich nur durch eine Bandenverschiebung: Die Bande im Kombinationsspektrum bei 1605 cm^{-1} ist beim oxydierten Pyrogallol bei 1635 cm^{-1} und beim Huminsäurespektrum bei 1630 cm^{-1} aufzufinden. Die Verschiebung dieser der aromatischen -C = C - Valenzschwingung zugeordneten Bande läßt keinen Rückschluß auf strukturelle Gegebenheiten zu, da eine Beurteilung nur im Zusammenhang mit der um 1500 cm^{-1} auftretenden Bande möglich ist. Diese Bande ist aber in allen drei Spektren nicht vorhanden.

Das Spektrum des Resorcin weist nach der Reaktion noch Bereiche deutlicher Absorption auf, die im Kombinationsspektrum teilweise nicht mehr aufzufinden sind.
So ist die der 1,3 Substitution von Aromaten zuzuordnende Bande bei 1490 cm^{-1} im Spektrum des Resorcins deutlich vorhanden, tritt aber in der Kombination nicht mehr auf.

Auch die Doppelbande um 1300 cm^{-1} (sie wird aromatischen Aldehyden zugeordnet) ist in der Kombination nicht vorhanden, während die um 1400 cm^{-1} liegende Absorption, ebenfalls als Einfachbindungsschwingung der aromatischen Aldehyde einzuordnen, sich mit der aus dem Huminstoff stammenden Bande dieser Wellenzahl deckt. Die Banden bei 775 cm^{-1} und 740 cm^{-1} - beide zeigen einen aromatischen Ring an, der drei benachbarte freie H-Atome aufweist - sind in dem Kombinationsspektrum nicht mehr vorhanden. Auch bei dieser Spektrengruppe hat die schon beschriebene Bandenverschiebung der Bande bei 1635 cm^{-1} in der Huminsäureprobe auf 1605 cm^{-1} im Kombinationsspektrum stattgefunden.

Das Infrarotspektrum des oxydierten Orcins weist nach der Reaktion in der Warburg-Apparatur eine differenzierte Bandenstruktur auf, die bei der gleichbehandelten Kombination nicht mehr vorhanden ist. So ist die den Sechsring-Ketonen zuzuordnende Bande um 1710 cm^{-1} in der Kombination vollständig ausgelöscht. Die im Huminstoff bei 1635 cm^{-1} liegende Bande wird hier ebenfalls nach 1605 cm^{-1} verschoben und fällt dort mit der Absorption des Orcin zusammen. Die Banden bei 1510 und 1480 cm^{-1} (-C = C- Ringschwingungen), in der Einzelprobe noch gut zu erkennen, sind im Kombinationsspektrum ebenfalls nicht mehr vorhanden. Weiterhin ist besonders das Verschwinden der die 1,3,5-Substitution anzeigende Bande bei 1260 cm^{-1} aus dem Kombinationsspektrum zu beachten, da sie in der Orcin-Einzelprobe sehr stark ausgeprägt ist. Auch bei 1135 und 1120 cm^{-1}, ebenfalls den 1,3,5 trisubstituierten Benzolen zuzuordnende Schwingungen, treten die Banden nur in der Einzelprobe des Orcin auf. Absorptionen bei 820 und 760 cm^{-1} (KUDZIN und NORD (1951) ordnen sie den substituierten Phenylringen zu) entfallen im Spektrum der Kombination vollständig.

Für das Phloroglucin konnten anhand der IR-Spektroskopie keine Differenzen zwischen den Einzelproben und der Kombination nachgewiesen werden.

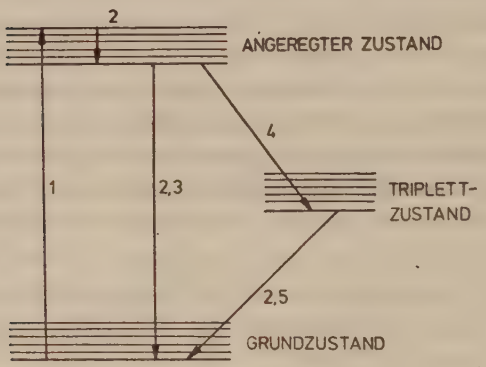
3.3.4. Fluoreszenz

Wird das zu untersuchende chemische System mit Licht des ultravioletten oder sichtbaren Bereichs bestrahlt, so erfolgt eine für die Substanz charakteristische Absorption (Schema 2,1) einer oder mehrerer ganz bestimmter Wellenlängen. In dem hier betrachteten Bereich des Spektrums bedeutet das eine Anregung von Elektronen, die durch die aufgenommene Energie vom Grundzustand in den energetisch höherliegenden angeregten Zustand überführt werden. In diesem angeregten Zustand verharren die Elektronen im allgemeinen für maximal 10^{-8} sec. Die sich anschließende Energieabgabe kann auf drei unterschiedliche Arten erfolgen (siehe dazu auch Schema 2):

1. strahlungslose Desaktivierung (2)
   (Z.B. die angeregten Teilchen stoßen mit Lösungsmittelmolekülen zusammen und verlieren dabei die aufgenommene Energie)
2. Phosphoreszenz
   (Es erfolgt die energieverzehrende Spinumkehr eines Elektrons (4); aus dem so erreichten Triplettzustand erfolgt die Desaktivierung durch Abstrahlung von Licht, diese Erscheinung wird als Phosphoreszenz bezeichnet (5), oder wieder strahlungslos (2) z.B. durch Wärmebewegung)
3. Fluoreszenz (3)
   (Die Energie wird in Form einer Lichtemission abgegeben)

Da die Absorption komplexer Moleküle in der Regel im angeregten Zustand in höhere Schwingungsniveaus führt, die Fluoreszenzemission aber ausschließlich vom untersten Schwingungsniveau des angeregten Zustands ausgeht, ist

die Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz größer als die der Absorption. Die Energie zwischen den beiden Schwingungszuständen wird strahlungslos abgegeben (2). Je größer diese Energiedifferenz ist, desto weiter wird auch die Fluoreszenzwellenlänge maximaler Intensität von der Anregung weg in den längerwelligen Bereich verschoben.



Schema 2: Möglichkeiten der Desaktivierung eines angeregten Elektrons (Erläuterungen im Text)

Im Bereich der Huminstoffe wurde die Fluoreszenz von KLEIST und MÜCKE (1966a) an natürlichen Huminstoffen und von ZIECHMANN an synthetischen Huminsäuren eingesetzt. Daß die Ergebnisse dieser Untersuchungen die Autoren nicht voll befriedigen konnten, ist sicherlich auf das verwendete Lösemittel zurückzuführen. So wird von KLEIST und MÜCKE 0,01 n NaOH angewendet, womit dann die Huminsäuren in pH-Bereiche verbracht werden,

in denen sicher alle phenolischen Hydroxygruppen vollständig dissoziiert vorliegen. Untersuchungen haben aber gezeigt (BRIDGES, 1963), daß der pH-Wert der Lösung die Fluoreszenz der Moleküle entscheidend beeinflußt. Für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren der Phenole hat sich ein pH-Wert von 5 als optimal herausgestellt. Bei pH-Werten über 7 sinkt die relative Fluoreszenzintensität mit zunehmendem pH-Wert schnell ab, denn die Phenole beginnen hier zu dissoziieren. Da aber die undissoziierte phenolische OH-Gruppe für die Fluoreszenz der Phenole hauptsächlich verantwortlich gemacht wird (BRIDGES, 1963), sollte auch bei den Huminsäuren dem pH-Wert der Lösung Aufmerksamkeit zugewandt werden. Als extreme Begrenzungen waren hier einerseits im Alkalischen die geringe Fluoreszenz der Phenole gegeben, andererseits aber auch die bei niedrigen pH-Werten beginnende Assoziation und Ausfällung der Huminsäuren (unterhalb pH 2).
Die Huminsäure wurde in Konzentrationen von 10 mg/l in Phosphatpuffer der pH-Werte 8,7,6 und 5 gebracht (die Konzentration von 10 mg/l konnte in Vorversuchen als die optimale ermittelt werden). Zusätzlich noch wurde eine Huminsäurelösung mit RIEDEL DE HAEN Pufferlösung pH 2,00 (Nr.33541) bereitet. Von den Lösungen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm die Fluoreszenz im Maximum des Spektrums bei 445 nm vermessen. Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität der Huminsäure vom pH-Wert (Abb.27).

Da die maximale Fluoreszenz bei pH 5 erreicht wurde und auch die Phenole hier optimale Fluoreszenz zeigen, werden die folgenden Untersuchungen in Lösungen mit dem pH-Wert 5,0 durchgeführt.

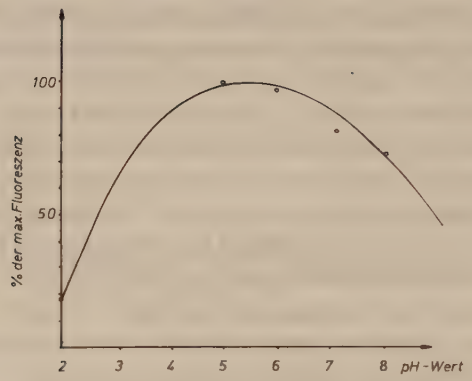


Abb.: 27 Relative Fluoreszenz der Modellhuminsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert des Lösungsmittels

Die Reaktionsprodukte des Warburg-Versuchs werden auf die optimale Konzentration verdünnt (0,06 ml Reaktionslösung auf 10 ml Phosphatpuffer pH 5,0) und im Fluoreszenzspektrophotometer vermessen. Um eventuell auftretende Eigenfluoreszenz des Lösungsmittels feststellen zu können, wird jeweils eine Probe aus dem Thermobarometer der Warburg-Apparatur entnommen und als Blindwert verdünnt mitvermessen.

Charakteristisch für ein Fluoreszenzspektrum ist neben der spektralen Verteilung des Fluoreszenzlichtes und der relativen Fluoreszenzintensität auch die Wellenlänge der maximal anregenden Strahlung.

Für die Modellhuminstoffe wurde eine maximale Fluoreszenz bei 445 nm ermittelt, wenn mit Licht der Wellenlänge 320 nm angeregt wurde. Die eingesetzten Phenole ergaben maximale Fluoreszenzen um 300 nm bei einer Anregung um 275 nm (einen Überblick über die Ergebnisse gibt die Tabelle 14).

Tab.: 14 Auswertung der Fluoreszenzspektren der Produkte der Reaktion zwischen Modellhuminsäure und Phenolen

Anregungswellenlänge (nm)	Fluoreszenzmaxima (nm) mit zugehörenden relativen Fluoreszenzintensitäten (Skt) oxydiertes Phenol	Huminsäure	Kombination	eingesetztes Phenol
270	295/60	295/0	295/19	Phenol
320	445/3,5	445/16	445/77	
275	305/89	305/0	305/22,5	p-Kresol
320	445/0	445/55	445/77	
290	325/95	325/0	325/35,5	Hydrochinon
320	445/59	445/56	445/110	
280	310/72	315/3,5	315/11,5	Brenzkatechin
320	445/11	445/69	445/37,5	
312	420/93	445/49,5	445/78	Pyrogallol
320	425/43	445/56,5	445/99	
275	303/98,5	303/0	303/15,5	Resorcin
320	455/7	445/8	455/57	
275	300/70	300/0	300/18	Orcin
320	445/5,5	445/72	445/33	
Keine Fluoreszenz beim Phloroglucin				Phloroglucin

Die Einzelspektren wurden mit unterschiedlichen Geräteparametern vermessen, es sind daher die Fluoreszenzintensitäten für die einzelnen Versuche nur bei je einer Anregungswellenlänge vergleichbar.

Die Interpretation der Fluoreszenzspektren muß, wie schon bei der Absorptionsspektroskopie, davon ausgehen,

daß die Fluoreszenz der Kombinationslösung eine Summierung der Einzelfluoreszenzen ergibt, wenn beide Stoffe sich unbeeinflußt voneinander in der Lösung befinden. Es ist daher notwendig, die Fluoreszenz nicht nur im Maximum der jeweiligen Einzelkomponente zu ermitteln, sondern auch die zweite Komponente unter gleichen Voraussetzungen zu vermessen.

Aus der Tabelle 14 sind drei unterschiedliche Typen der gegenseitigen Beeinflussung der Huminsäure und der Phenole in der Kombinationslösung zu ermitteln:

1. Die Fluoreszenzintensität der Kombination bei der maximalen Anregungswellenlänge des Phenols ist niedriger als die Summe der Intensitäten der Einzelfluoreszenzen. Die Fluoreszenzintensität bei der maximalen Anregungswellenlänge der Huminsäure ist ebenfalls niedriger als die Summe der Einzelfluoreszenzen (siehe Tab.14 Brenzkatechin, Orcin).
2. Die Fluoreszenzintensität der Kombination bei der maximalen Anregungswellenlänge des Phenols ist niedriger als die Summe der Einzelfluoreszenzen. Bei der maximalen Anregungswellenlänge der Huminsäure entspricht die Summe der Einzelfluoreszenzen aber der Fluoreszenzintensität der Kombination (siehe Tab.14 Hydrochinon, Pyrogallol).
3. Die Fluoreszenzintensität der Kombination bei der maximalen Anregungswellenlänge des Phenols ist niedriger als die Summe der Einzelfluoreszenzen; bei der Wellenlänge der maximalen Anregung des Huminstoffes ist die Fluoreszenz der Kombination hingegen höher als die Summe der Einzelfluoreszenzen (siehe Tab.14 Phenol, p-Kresol, Resorcin).

Die unter 1 charakterisierte Abnahme der Fluoreszenz der Kombination sowohl bei der Wellenlänge der maximalen Anregung für das Phenol und für die Huminsäure macht

eine Aussage über mögliche Bindungen zwischen den Phenolen und der Huminsäure nicht möglich, da die Effekte bei beiden Anregungen parallel laufen. Es können hier also äußere Bedingungen die Spektren verändern.

Bei den Versuchen mit Hydrochinon und Pyrogallol (2.Typ) entspricht die Fluoreszenzintensität der Kombination bei der Anregungswellenlänge des Huminstoffs etwa der Summe der Einzelkomponenten. Diese Summierung der Fluoreszenzen ist dadurch zu erklären, daß die durch die Oxydation aus den Phenolen entstandenen Produkte der eingesetzten Modellhuminsäure strukturell nicht unähnlich sind. Es fluoreszieren also bei der Anregung bei 320 nm (optimale Anregungswellenlänge der Huminsäure) bei den "Phenolproben" bereits die den Huminsäurevorstufen ähnlichen Autoxydationsprodukte, die dann die bei dieser Anregung geringe Fluoreszenz der restlichen Phenole überdecken. Die Oxydationsprodukte der Phenole verstärken in der Kombination die Fluoreszenz der Huminsäure. Bei maximaler Anregung der Phenole (290 bzw. 312 nm)kann die Abnahme der Fluoreszenz in der Kombination gegenüber der Summe der Einzelintensitäten in diesem Fall nicht mehr auf äußere Einflüsse zurückgeführt werden. Die Abnahme beruht vielmehr auf einer Verminderung der freien Phenolteilchen in der Kombinationslösung.

Das Verhalten der dritten Gruppe (siehe dazu Abb.28) läßt auf eine feste Bindung zwischen Huminsäure und Phenol schließen. Aus Tab.14 ist zu ersehen, daß die Summe der Einzelfluoreszenzen bei der Phenolanregung (270 bzw.275 nm) jeweils größer ist als die Fluoreszenzintensität der Kombinationsprobe. Die Abnahme ist wieder durch aus der Lösung entferntes Phenol zu erklären. Dieses Phenol ist an den Huminstoff gebunden und dann bei der Anregung durch die für die Huminstoffe spezifische Wellenlänge (320 nm) für die erheblich stärkere Fluoreszenz der Kombination verantwortlich.

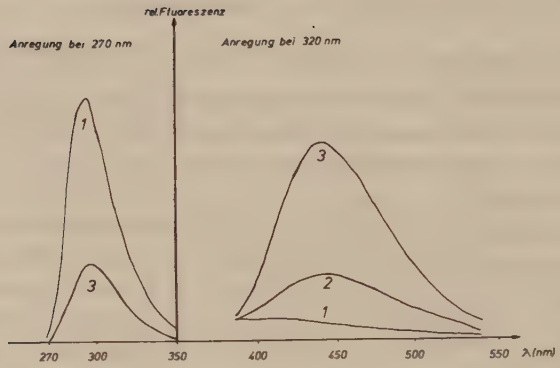


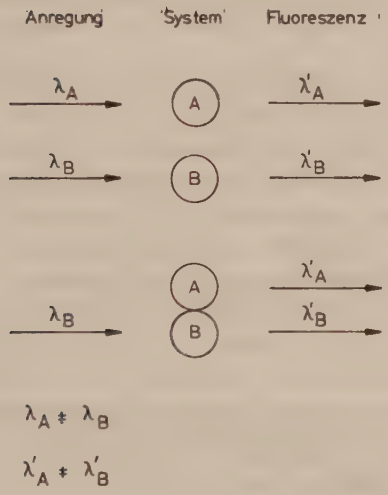
Abb.: 28 Spektrale Verteilung des Fluoreszenzlichtes bei Anregungen von 270 nm und 320 nm der Oxydationsprodukte in Puffer pH 5,0

(1) oxydiertes Phenol
(2) Modellhuminsäure
(3) Kombination aus Phenol und Modellhuminsäure

Die Proben wurden dem Warburg-Versuch entnommen und verdünnt (0,06 ml Reaktionslösung auf 10 ml Puffer pH 5,0)

Als ein weiterer Nachweis einer festen Bindung zwischen den Phenolen und der Huminsäure kann die erfolgreiche Durchführung eines schon von LAUTSCH u.a. (1959) an Proteinen beschriebenen Versuchs angesehen werden. Das Prinzip des Experiments soll hier kurz dargestellt werden (Schema 3):

Ein Stoff A wird mit der Wellenlänge λ_A angeregt und zeigt bei λ'_A Fluoreszenz. Wird eine Verbindung mit einem Stoff B hergestellt, der bei der Wellenlänge λ_B angeregt bei λ'_B fluoresziert, so wird nach der Substitution der Stoff A auch bei einer Anregung mit λ_B eine Fluoreszenz bei λ'_A zeigen.



Schema 3: Energieleitung bei einer Verbindung aus zwei unterschiedlichen Substanzen (Erläuterungen im Text)

Hier konnte dieser Versuch für folgenden Schluß eingesetzt werden: Gelingt es, bei Einstrahlung von λ_A die Fluoreszenzemission bei λ_B zu messen, dann ist auch eine echte chemische Bindung zwischen beiden Systemen erwiesen.

Mit den aus dem Oxydationsversuch "Huminsäure mit Resorcin" gewonnenen Reaktionsprodukten konnte das Experiment erfolgreich durchgeführt werden (Abb.29).

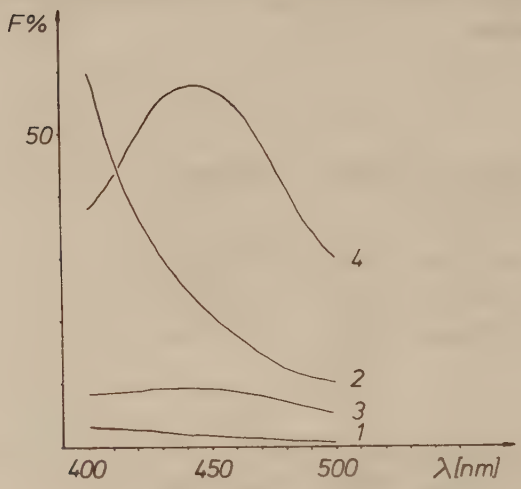


Abb.: 29 Spektrale Verteilung des Fluoreszenzlichtes der Oxydationsprodukte in Puffer pH 5,0 bei einer Anregung von 275 nm

(1) Phosphatpuffer pH 5,0
(2) oxydiertes Resorcin
(3) Modellhuminsäure
(4) Kombination aus Resorcin und Modell-huminsäure

Die Proben wurden dem Warburg-Versuch entnommen und verdünnt (0,06 ml auf 10 ml Puffer pH 5,0)

Die Anregung erfolgte bei der für das Resorcin spezifischen Wellenlänge von 275 nm; die Fluoreszenz zeigte bei der Kombination ein deutliches Maximum bei der für die Huminstoffe spezifischen Wellenlänge von 445 nm. Das Resorcin und das Lösungsmittel zeigten kein Maximum, bei den Huminstoffen allein war nur eine sehr geringe Fluoreszenzerhöhung festzustellen. Es ist also hiermit der Nachweis einer festen chemischen Bindung erbracht.

3.3.5. Chromatographische Untersuchung der Reaktionsprodukte

Nach Abschluß der Gaswechselmessungen wurden die erhaltenen Reaktionsprodukte einer dünnschichtchromatographischen Trennung unterworfen, um weitere Unterschiede zwischen den Einzelkomponenten und der Kombinationslösung zu ermitteln. In Vorversuchen wurde das optimale Trägermaterial und Laufmittel ausgesucht: Die chromatographische Trennung wurde an einer Celluloseschicht mit Äthanol (versetzt mit 0,5% Toluol) Wasser im Verhältnis 6 : 4 als Laufmittel durchgeführt. Die Verteilungschromatographie scheint schon deshalb am geeignetsten, da sie Unterschiede in der Teilchengröße am besten zum Ausdruck bringt, gleichzeitig aber auch die Polarität der Substituenten berücksichtigt (RANDERATH, 1972).

Es wurden parallel die zu den jeweiligen Ansätzen gehörenden Einzelkomponenten und die Kombinationslösung auf der gleichen Platte und in gleicher Menge (je 20 ul) aufgetragen, so daß innerhalb eines jeden Ansatzes eine strenge Vergleichbarkeit gegeben ist. Untereinander sollten die Ansätze nicht verglichen werden, da viele unkontrollierbare Faktoren eine Verschiebung der R_f-Werte bewirken können (GÄNSHIRT).

Die Ergebnisse werden als R_f-Werte in der Tabelle zusammengestellt.

Die Errechnung der R_f-Werte erfolgte nach der Formel:

$$R_f = \frac{\text{Entfernung vom Start bis zum unteren Band des Flecks}}{\text{Entfernung vom Start bis zur Laufmittelfront}}$$

Die Unterschiede der R_f-Werte innerhalb der einzelnen Ansätze wurden durch mehrfache Wiederholung abgesichert.

Tab.:15 Auswertung der Dünnschichtchromatogramme der Produkte der Reaktion von Modellhuminsäure mit den Phenolen

Versuchsansatz	R_f - Werte			
	oxydierte Phenole	Huminsäure	Kombination	Bemerkung
Phenol	0,66	0,63	0,63	
p-Kresol	0,67	0,59	0,65	
Hydrochinon	0,63	0,46	0,50	kein Fleck bei R_f = 0,63 i.d. Kombination
Brenzkatechin	0,61	0,56	0,59	
Pyrogallol	0,64	0,61	0,64	
Resorcin	0,60	0,44	0,53	kein Fleck bei R_f=0,60 i.d. Kombination
Orcin	0,59 0,91	0,55	0,58	kein Fleck bei R_f=0,91 i.d. Kombination
Phloroglucin	0,65	0,58	0,60 0,76	kein Fleck bei 0,76 i.d. Phloroglucin-einzelprobe

Von den Ergebnissen (Tab.15) sind generell zwei Punkte herauszustellen:

- Die R_f-Werte der Huminsäure liegen sowohl unter denen der eingesetzten Phenole als auch unter den R_f-Werten der Kombination.
- Die R_f-Werte der Kombination liegen, mit Ausnahme des zweiten Wertes in der Phloroglucinkombination, unter denen der Phenole.

Sehr deutliche Unterschiede zwischen den Einzelproben und der Kombination sind sowohl hinsichtlich der R_f-Werte als auch in bezug auf die Anzahl der Flecken bei den Proben Hydrochinon, Resorcin, Orcin und Phloroglucin aufgetreten, somit bei den Phenolen, bei denen auch bei den Gaswechselmessungen die größten Differenzen in der Sauerstoffaufnahme auftraten.
Die Ergebnisse der Ansätze mit Phenol, Brenzkatechin und Pyrogallol lassen keine eindeutigen Schlüsse zu, da die R_f-Werte der Einzelproben sehr dicht bei denen der Kombination liegen.

Für das Hydrochinon ergibt sich, daß der Fleck der Einzelprobe (R_f = 0,63) in der Kombination, die nur einen Fleck bei 0,50 aufweist, deutlich nicht mehr vorhanden ist. Gleiches trifft auch für das Resorcin zu (Tab.15). Bei der Einzelprobe des oxydierten Orcin ist auf dem Chromatogramm ein Fleck mit einem R_f-Wert von 0,91 zu finden, der in der Kombination nicht mehr vorhanden ist. Wie ein Vergleich zeigt, handelt es sich hier um noch nicht oxydiertes Orcin. Die Kombination des Ansatzes mit Phloroglucin weist einen Fleck mit einem R_f-Wert von 0,76 auf. Es handelt sich hier um noch relativ niedermolekulare Oxydationsprodukte, die in der Einzelprobe nicht zu finden sind.

Aussagen über die Art der Wechselwirkung zwischen den Phenolen und Huminsäuren können aus diesen Ergebnissen allein nur bedingt gewonnen werden, da zwei gegenläufige Faktoren die R_f-Werte der einzelnen Substanzen beeinflussen. So ist die geringere Teilchengröße der Oxydationsprodukte der Phenole und deren bessere Löslichkeit in Äthanol dafür verantwortlich, daß sie auf der Dünnschichtplatte schneller wandern als die Huminstoffe. Die Kombinationslösung hingegen weist größere Teilchen auf als die Oxydationsprodukte der Phenole, so daß ihre Flecken auf dem Chromatogramm durch geringere R_f-Werte gekennzeichnet sind. Andererseits aber ist die Löslichkeit der Verbindung aus Huminsäure und dem jeweiligen Phenol in

Äthanol gegenüber dem Huminstoff allein verbessert, was dazu führt, daß ihre R_f-Werte höher liegen als die der Huminsäureproben.

3.3.6. Gelfiltration

Hinsichtlich der Gelfiltration an Sephadex kann davon ausgegangen werden, daß bei Verwendung wässriger Lösungen oder Lösungsmittelgemischen als Elutionsmittel eine Auftrennung der eingesetzten Substanzen ausschließlich nach der Teilchengröße erfolgt. Bei einer Gleichbehandlung mehrerer Proben können relative Teilchengrößenverteilungen ermittelt werden. Es soll hier am Beispiel der Wechselwirkung (Bindung) zwischen Hydrochinon und der Modellhuminsäure untersucht werden, ob eine Vergrößerung der Teilchen in der Kombinationslösung nach der Reaktion festzustellen ist.

In Vorversuchen wurde ein geeignetes Lösungsmittel und das optimale Gel ermittelt. Die Auftrennung erfolgt im folgenden an Sephadex LH - 20 mit Äthanol/Wasser 1:1 (der Äthylalkohol war mit Toluol vergällt). An Sephadex LH-20 können Teilchen bis zu einem Molekulargewicht von ca 10 000 aufgetrennt werden (DE HAAN, 1972). Größere Teilchen werden mit dem ersten Lösungsmittel aus der Säule gespült. Das Blindvolumen beträgt nach Angaben des Herstellers etwa 40% des Gesamtvolumens der fertiggepackten Säule (SÖCHTIG,1966; SEPHADEX, 1974). Es läßt sich also für jede Trennung genau ermitteln, ob die Fraktion dem Vorlauf angehört oder eine erste Fraktion der Trennung darstellt.

Über eine mit Sephadex LH-20 beschickte Säule der Dimension 2 x 45 cm werden nacheinander jeweils 7,5 ml folgender drei Proben eines parallel zu den Warburg-Versuchen durchgeführten vergrößerten Ansatzes gegeben:

1. autoxydiertes Hydrochinon
2. Modellhuminsäure
3. Kombinationslösung (Reaktionsgemisch aus Modellhuminsäure und Hydrochinon)

Die Proben waren in gleicher Konzentration angesetzt und wurden den gleichen Reaktionsbedingungen unterworfen wie in 3.3.1. beschrieben.

Die eluierten Lösungen wurden in Portionen zu je 1,0 ml in einem Fraktionssammler aufgefangen und im sichtbaren Bereich an einem Photometer bei 436 nm die Extinktion vermessen.

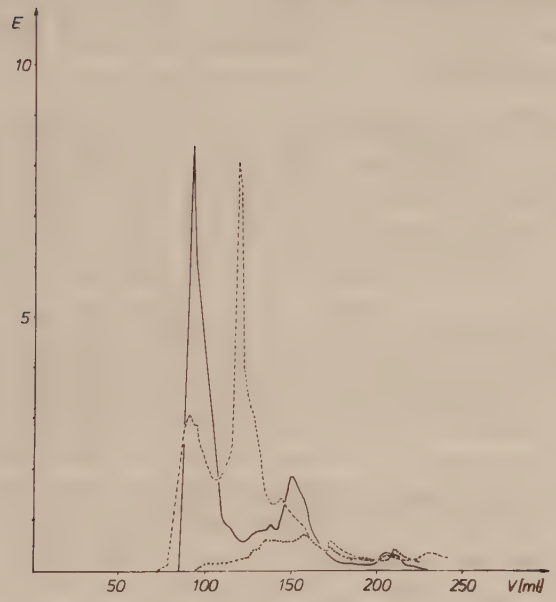


Abb.: 30 Elutionsdiagramme der Auftrennung der Reaktionsprodukte an Sephadex LH 20

..... (1) Oxydationsprodukte des Hydrochinon
------ (2) Modellhuminsäure
_____ (3) Kombination aus Hydrochinon und Modellhuminsäure

In der Abb.30 ist die Extinktion gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Der Verlauf der Elutionsdiagramme ist durch dreifache Wiederholung gesichert.

Die drei Elutionsdiagramme können, da sie unter exakt gleichen Voraussetzungen ermittelt wurden, als relative Teilchengrößenverteilungsdiagramme angesehen werden, denn das Volumen des Elutionsmittels ist reziprok proportional dem Molekulargewicht der eluierten Teilchen. Da bei den Huminsäuren von einem Molekulargewicht wegen der unbekannten und wechselnden Struktur nicht gesprochen werden kann, ist als Parameter besser die Teilchengröße zu verwenden.

Das Volumen des Lösungsmittels, das sich außerhalb der Gelkügelchen in der Säule befindet - es sind ca 57 ml (40% des Gesamtvolumens der Säule) - tritt ohne Färbung durch die Säule hindurch, was bedeutet, daß Teilchen mit einer Größe über TM 10 000 nicht vorhanden sind.

Bei dem Elutionsvolumen von 92 ml zeigt die aufgetragene Huminsäure ein Maximum (E = 3,1). Dieses Maximum ist auch bei der Auftrennung der Kombinationslösung wiederzuerkennen, doch ist es hier ganz erheblich erhöht (E = 8,3), was bedeutet, daß in der Kombination nun eine höhere Anzahl Teilchen dieser Teilchenmasse vorhanden ist. Da gleichzeitig bei der Auftrennung der Kombination auch noch das Maximum der Huminsäure bei 120 ml fehlt (E = 8,1), kann sicher geschlossen werden, daß hier die Teilchen, die bei der Huminstoffprobe bei 120 ml Elutionsvolumen die Säule verlassen durch Bindung von Hydrochinon vergrößert und daher schon mit 92 ml Äthanol/Wasser-Gemisch zu eluieren sind.

Die Elektronenspektren der jeweils maximal absorbierenden Fraktionen (Huminstoff bei 120 ml, Kombination bei 92 ml) wiesen, wie nicht anders zu erwarten, keine Unterschiede auf.

3.4. Wechselwirkungen zwischen den Phenolen und methylierter Modellhuminsäure

Nachdem dargestellt wurde, daß eine Bindung zwischen den eingesetzten Phenolen und der Modellhuminsäure unter den hier herrschenden Reaktionsbedingungen stattfindet, ist noch zu klären, welche Strukturteile bzw. funktionelle Gruppen der Huminsäuren für diese Bindungen notwendig sind.

Dafür wird die in den vorhergehenden Versuchen eingesetzte Huminsäure mit Diazomethan methyliert. Da Diazomethan mit sauerstoffunktionellen Gruppen reagiert, werden bei der Huminsäure Carboxyl-, phenolische und aliphatische Hydroxygruppen und teilweise auch die Aldehydgruppen erfaßt (KHAN, 1968). Der bei der Methylierung mit Diazomethan mögliche Angriff auf die chinoide Carbonylgruppe wurde nicht betrachtet, da die entstehenden Hydroxygruppen sofort wieder methyliert wurden, so daß neue funktionelle Gruppen nicht entstanden. An Stickstoff gebundener Wasserstoff kann ebenfalls durch die Methylgruppe ersetzt werden, was hier nicht ins Gewicht fällt, da die benutzte Modellhuminsäure keinen Stickstoff enthält.

Der Erfolg der Methylierung wurde durch IR-Spektren kontrolliert (Abb.31).

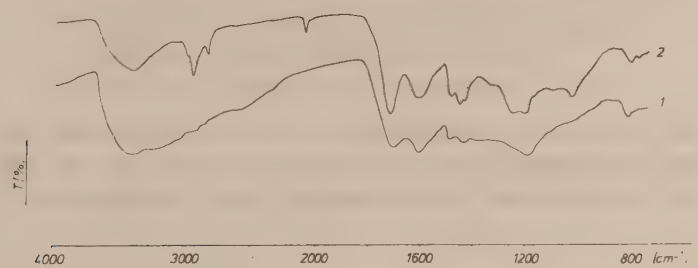


Abb.:31 IR-Spektren der eingesetzten Huminsäuren
(1) Modellhuminsäure aus Hydrochinon
(2) methylierte Modellhuminsäure aus Hydrochinon

3.4.1. Gaswechselmessungen

Mit der Gaswechselmessung sollen Unterschiede im Verhalten der unmethylierten und der methylierten Huminsäure bei der Wechselwirkung (Bindung) gezeigt werden. Die Untersuchung wird am Beispiel des Hydrochinons als Phenol durchgeführt.

Durch die Methylierung hat sich die Löslichkeit der Huminsäure stark verändert: Die methylierte Huminsäure ist in Puffer pH 8,0 nicht mehr in einem solchen Maße löslich, daß ein Versuch noch durchzuführen war. Es mußte daher ein neues Lösungsmittel gesucht werden, in dem sich sowohl die Ausgangs- als auch die methylierte Huminsäure löst. Als beste Möglichkeit hat sich durch Vorversuche ein Gemisch aus Pyridin und Phosphatpuffer pH 8,0 im Verhältnis 4 : 6 erwiesen.

Es wurde durch das neue Lösemittel notwendig, auch die nichtmethylierte Huminsäure einer Gaswechselmessung mit dem eingesetzten Phenol zu unterwerfen, da nur so ein exakter Vergleich der beiden Ansätze möglich war.

Die Messungen wurden in der Warburg-Apparatur unter den gleichen Bedingungen wie in 3.3.1. durchgeführt. Änderungen wurden durch die auch in diesem Lösemittel begrenzte Löslichkeit der methylierten Huminsäure notwendig. So wurden andere Konzentrationen in den Versuchsgefäßen verwendet:

- Hydrochinon 0,025 m
- Huminsäure 5 mg/3 ml
- methylierte Huminsäure 5 mg/3 ml

Die Ergebnisse der Messung der Sauerstoffaufnahme sind für die unmethylierten Huminstoffe in Abb.32 und für die methylierten Huminsäuren in Abb.33 dargestellt.

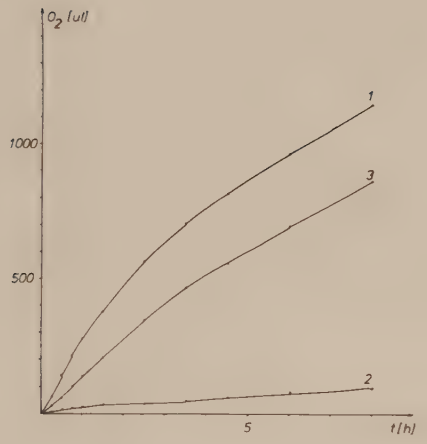


Abb.: 32 Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Hydrochinon in Gegenwart von Modellhuminsäuren im Lösemittelgemisch Pyridin / Phosphatpuffer pH 8,0 wie 4 : 6

(1) Sauerstoffaufnahme des Hydrochinon (0,025 m)
(2) Sauerstoffaufnahme der Modellhuminsäure (5 mg/3 ml)
(3) Sauerstoffaufnahme der Kombination aus Hydrochinon (0,025 m) und Modellhuminsäuren (5 mg / 3 ml)

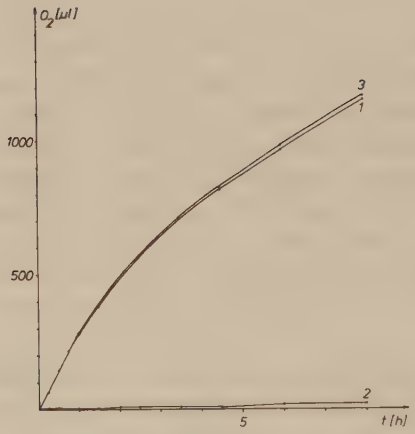


Abb.: 33 Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Hydrochinon in Gegenwart von methylierten Modellhuminsäuren in Pyridin/ Phosphatpuffer pH 8,0 wie 4 : 6

(1) Sauerstoffaufnahme des Hydrochinon (0,025 m)
(2) Sauerstoffaufnahme der methylierten Modellhuminsäure (5 mg/ 3 ml)
(3) Sauerstoffaufnahme der Kombination aus Hydrochinon (0,025 m) und methylierter Modellhuminsäuren (5 mg/ 3 ml)

Werden die Sauerstoffaufnahmen der Kombinationslösungen mit der jeweiligen Summe der O_2-Aufnahmen der Einzelkomponenten verglichen, so ist das Ergebnis dieses Versuchs ganz deutlich zu erkennen (Abb.34).

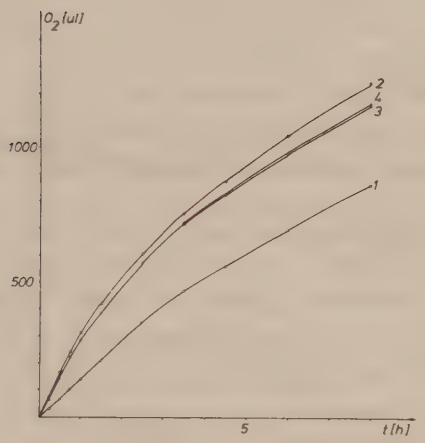


Abb.: 34 Vergleich der Sauerstoffaufnahmen der Kombinationen und der Summen der Einzelaufnahmen von den Oxydationen des Hydrochinons in Gegenwart von Modellhuminsäure und methylierter Modellhuminsäure in Pyridin/Phosphatpuffer pH 8,0 wie 4:6

(1) Kombination aus Hydrochinon und Modellhuminsäure (5 mg/ 3 ml)
(2) errechnete Summe der Einzelaufnahmen von Hydrochinon (0,025 m) und Modellhuminsäure (5 mg/3 ml)
(3) Kombination aus Hydrochinon (0,025 m) und methylierter Modellhuminsäure (5 mg/ 3 ml)
(4) errechnete Summe der Einzelaufnahmen von Hydrochinon (0,025 m) und methylierter Modellhuminsäure (5 mg/3 ml)

Die Summe der Einzelsauerstoffaufnahmen ist bei der Verwendung der methylierten Huminsäure gleich der Kombination, wohingegen bei Einsatz der unmethylierten Huminsäure auch in diesem Lösungsmittelgemisch eine deutliche Minderaufnahme der Kombination gegenüber der Summe der Einzelkomponenten auftritt. Es muß also angenommen werden, daß eine Reaktion zwischen der methylierten Huminsäure und dem Hydrochinon nicht stattfindet.

3.4.2. Chromatographie

Da die Spektroskopie im UV-Bereich hier keine Aussage zuläßt - das Lösungsmittelgemisch absorbiert bis ca 310 nm -,soll als zweites Kriterium die Dünnschichtchromatographie herangezogen werden.

Es wird wieder auf einer Celluloseschicht mit Äthanol/Wasser im Verhältnis 1 : 1 (der Äthylalkohol ist mit 0,5% Toluol versetzt) gearbeitet.

Aus Tab.16 ist zu ersehen, daß die Kombination II (aus methylierter Huminsäure und Hydrochinon) mit der Hydrochinoneinzelprobe im R_f-Wert übereinstimmt; die methylierte Huminsäure ist auch hier am Startfleck zurückgeblieben.

Tab.: 16 Auswertung der Dünnschichtchromatogramme der Produkte der Oxydation von Hydrochinon mit methylierter Huminsäure

Versuchsansatz	R_f-Wert
Hydrochinon	0,60
Huminsäure	0,52
Kombination I (Hydrochinon + Huminsäure)	0,57
methylierte Huminsäure	---
Kombination II (Hydrochinon + methylierte Huminsäure)	0,60

Aus diesem Ergebnis kann zusammen mit dem der Gaswechselmessung gefolgert werden, daß das Hydrochinon und die methylierte Huminsäure nicht zusammen reagieren.

3.4.3. Untersuchungen an "Strukturteilen" der Huminstoffe

Durch den Einsatz der methylierten Huminsäuren konnte gezeigt werden, daß die für die Reaktion mit den Phenolen wichtige funktionelle Gruppe bei den Huminstoffen zu den methylierbaren gehört. Es handelt sich also um die aliphatische Hydroxy-, phenolische Hydroxy-, Aldehyd- oder Carboxylgruppe. Im folgenden muß durch Ausschluß die reagierende Gruppe gefunden werden.

Die in Frage kommenden Gruppen werden als Substitutionsprodukte des Benzols bei den Gaswechselmessungen mit Hydrochinon als Phenol eingesetzt.

1. Aliphatische Hydroxygruppe als Benzylalkohol
Von einer 0,0125 m Hydrochinon- und einer 0,0125 m Benzylalkohollösung werden zusammen als Kombinationslösung und einzeln in Puffer pH 8,0 in der Warburg-Apparatur die Gaswechselmengen ermittelt. Die Sauerstoffaufnahmen sind in Abb.35 dargestellt.

Der Vergleich der Kombination (Kurve 3 Abb.35) mit der Summe der O_2 - Aufnahmen der Einzelkomponenten (Kurve 1) zeigt deutlich, daß eine Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme des Hydrochinons durch den Benzylalkohol nicht stattfindet.

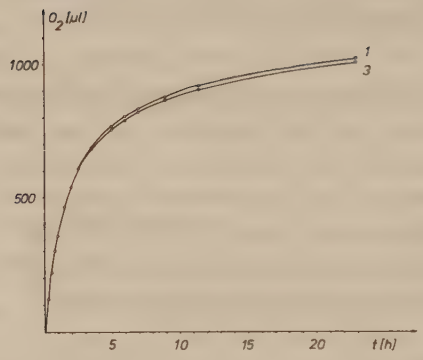


Abb.35 Verlauf der Sauerstoffaufnahme von Hydrochinon in Gegenwart von Benzylalkohol in Phosphatpuffer pH 8,0

(1) Hydrochinon (0,0125 m)
(3) Kombination aus Hydrochinon (0,0125 m) und Benzylalkohol (0,0125 m)

Der Benzylalkohol allein nimmt keinen Sauerstoff auf.

2. Aldehydgruppe als Benzaldehyd

Auch wenn Benzaldehyd in Puffer pH 8 mit Hydrochinon in molarem Verhältnis zusammen oxydiert (Hydrochinon 0,0125 m), entspricht die Summe der Sauerstoffaufnahmen der Einzelkomponenten genau der Sauerstoffaufnahme der Kombination (Abb.36).

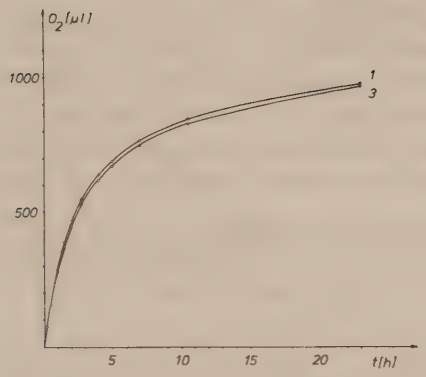


Abb.: 36 Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Hydrochinon in Gegenwart von Benzaldehyd in Phosphatpuffer pH 8,0

(1) Hydrochinon (0,0125 m)
(3) Kombination aus Hydrochinon (0,0125 m) und Benzaldehyd (0,0125 m)

Benzaldehyd allein nimmt keinen Sauerstoff auf.

3. Carboxylgruppe als Benzoesäure

Beim Einsatz der Benzoesäure als "Strukturteil" der Huminsäure mußte auf das Na-Salz zurückgegriffen werden, um eine pH-Wertverschiebung auszuschließen. Es konnte durch die Versuche in der Warburg-Apparatur auch hier gezeigt werden, daß ein Unterschied in der Sauerstoffaufnahme der Kombination verglichen mit der Summe der Einzelaufnahmen nicht vorhanden ist (Abb.37).

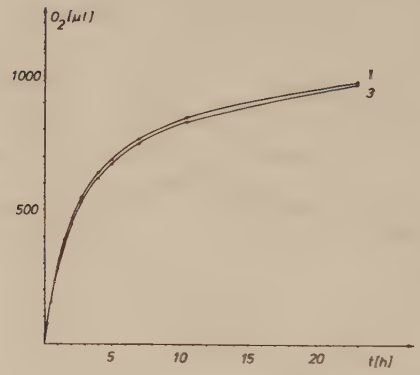


Abb.: 37 Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Hydrochinon in Gegenwart von Benzoesäurenatriumsalz in Puffer pH 8,0

(1) Hydrochinon (0,0125 m)
(3) Kombination aus Hydrochinon (0,0125 m) und Na-Benzoat (0,0125 m)

Das Na-Benzoat allein zeigt keine Sauerstoffaufnahme

Nach Abschluß der Reaktion wurde die Absorption im UV-Bereich gemessen: Bei allen drei Proben war zwischen dem Kombinationsspektrum und dem Summenspektrum der Einzelabsorptionen genaue Übereinstimmung festzustellen.

Folglich kann aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, daß die Reaktion der Huminsäuren mit den Phenolen über die phenolische Hydroxygruppe an den Huminsäuren verläuft.

3.5. Wechselwirkung der Phenole mit extrahierten natürlichen Huminsäuren

Hier soll anhand von drei Experimenten die Übertragbarkeit der Ergebnisse, die mit den Modellhuminstoffen erarbeitet wurden, auf die natürlichen Huminstoffe gezeigt werden. Es muß dabei davon ausgegangen werden, daß die natürlichen Huminstoffe, wenn sie aus dem Boden extrahiert und in ihrer Reaktionsfähigkeit erheblich eingeschränkt sind, die quantitativen Verhältnisse also bei den extrahierten Huminsäuren keinesfalls mit denen im Boden übereinstimmen müssen.

Es wurden hierfür die Huminstoffe aus dem Sonnenberger Moor (MÜLLER-WEGENER, 1974) soweit möglich in Wasser gelöst und dann elektrometrisch mit NaOH auf pH 7,0 titriert. Da bei dieser pH-Werterhöhung ein weiterer Teil der Huminsäure in Lösung geht, mußte nachtitriert werden. Diese Operation wurde so lange wiederholt, bis sich die gesamte Huminsäure gelöst hatte. Die auf pH 7 eingestellte Lösung wurde dann vorsichtig bis zur Trockene eingeengt. Dieses Natriumsalz war in ausreichender Konzentration in Puffer pH 8 löslich.

Die so aufbereitete natürliche Huminsäure wurde zusammen mit Hydrochinon einer Gaswechselmessung unterworfen, wobei folgende Konzentrationen eingesetzt wurden:

Huminsäuren 20 mg pro Ansatz (20 mg/3 ml)
Hydrochinon 0,025 m

Die relativ hohen Konzentrationen wurden hier gewählt, um möglichst kurze Reaktionszeiten zu erhalten. Im weiteren entsprachen die äußeren Bedingungen denen der Versuche in 3.3.1. (Temperatur 30°C, Schüttelfrequenz 70 min^{-1}), so daß ein Vergleich der Ergebnisse möglich ist.

Die Auswertung dieser Gaswechselmessung ergab eine deutliche Sauerstoffminderaufnahme der Kombination gegenüber der Summe der Sauerstoffaufnahmen der Einzelkomponenten.
Als weiteres Ergebnis mußte aber festgestellt werden, daß neben der rein chemischen Wechselwirkung hier auch biologische Abläufe stattfanden. So setzte nach etwa 6 h eine starke Sauerstoffaufnahme der Huminsäureprobe

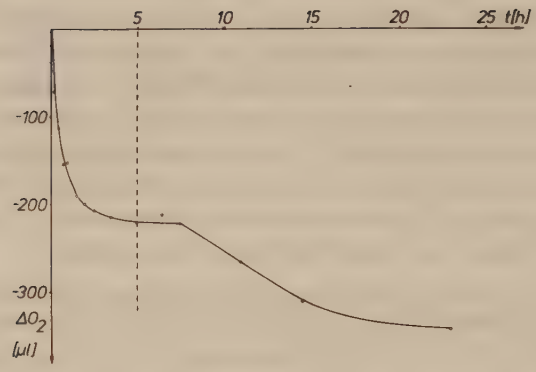


Abb.: 38 Verlauf der Sauerstoffaufnahmedifferenz der Reaktion zwischen Hydrochinon und natürlichen Huminsäuren aus der Kombination und der Summe der Sauerstoffaufnahmen der Einzelkomponenten

ein und eine etwas geringere der Kombination, die beide auf mikrobielle Tätigkeiten zurückzuführen waren. Diese plötzliche Sauerstoffaufnahme ist auch in Abb.38 sichtbar. Ein mit 0,1% Formaldehydlösung durchgeführter Parallelversuch zeigte diese Sauerstoffaufnahme nicht, führte aber zu Wechselwirkungen zwischen Formaldehyd und Hydrochinon (Polykondensation!).

Für eine weitere Auswertung wurden daher nur die Sauerstoffaufnahmedifferenzen bis zu einer Reaktionszeit von 5 h verwendet, da sich hier die Mikroorganismenkultur noch in der Anlaufphase befand und so nur sehr wenig und außerdem konstant Sauerstoff aufnahm (vgl.dazu: SCHLEGEL,1976).

Werden diese Werte zugrunde gelegt, so läßt sich aus den Reziprokwerten der Differenzen bei der Auftragung $1/\Delta O_2$ gegen $1/t$ (Abb.39) die maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz ermitteln

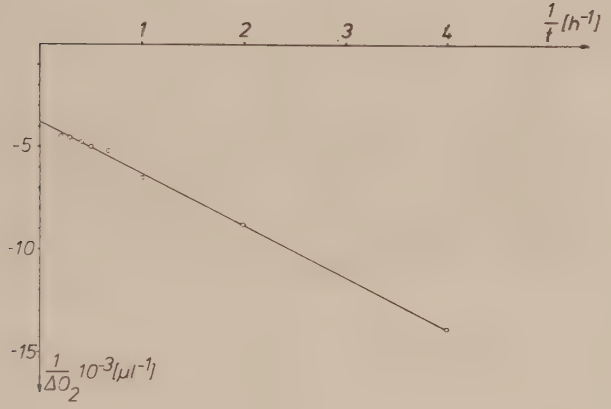


Abb.: 39 Verlauf der Sauerstoffaufnahmedifferenz (Sauerstoffminderaufnahme der Kombination gegenüber der Summe der Einzelaufnahmen) der Reaktion von Hydrochinon mit natürlichen Huminsäuren in reziproker Auftragung

Die maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz zwischen der Kombination und der Summe der Einzelsauerstoffaufnahmen von Hydrochinon und der natürlichen Huminsäure beträgt 267 µl. Aus der Eichkurve (Abb.19) läßt sich die Menge an Hydrochinon ermitteln, die einer Sauerstoffaufnahme von 267 µl entspricht: Es sind 0,0022 m Hydrochinon, d.h., daß 8,8% der Ausgangsmenge Hydrochinon an die Huminsäure gebunden werden.

In einem Parallelansatz wurden Einzelproben aus Hydrochinon (0,0125 m) und Huminsäure (10 mg/3 ml) sowie die Kombination beider Substanzen einer fünfstündigen Oxydation bei 30°C in Phosphatpuffer pH 8 unterworfen. Von den Reaktionsprodukten wurden Elektronenspektren im UV-Bereich aufgenommen (Abb.40).

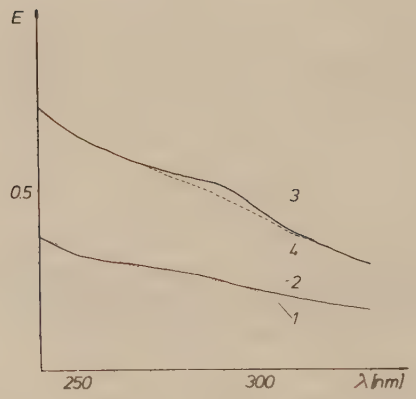


Abb.: 40 Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte aus der Reaktion von Hydrochinon mit natürlichen Huminsäuren in Puffer pH 8,0

(1) oxydiertes Hydrochinon
(2) natürliche Huminsäure
(3) Kombination aus Hydrochinon und natürlicher Huminsäure
(4) errechnete Summe der Einzelabsorptionen von Hydrochinon und den natürlichen Huminsäuren

Da die Unterschiede zwischen dem Summen- und dem Kombinationsspektrum relativ klein sind, wurden die Reaktionsprodukte einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung unterworfen.
Die R_f-Werte zeigen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen.

Tab.: 17 Auswertung der Dünnschichtchromatogramme der Oxydation von Hydrochinon mit natürlichen Huminsäuren

Versuchsansatz	R_f-Wert
Hydrochinon	0,49
natürliche Huminsäure	0,05
Kombination	0,25

An diesem Chromatogramm zeigt sich (die Ergebnisse sind durch Wiederholungen gesichert), daß die Huminstoffe in der Kombination vom Hydrochinon beeinflußt werden. Die Polarität der Huminsäure in der Kombination ist durch die an sie gebundenen Hydrochinonmoleküle deutlich erhöht.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Klärung folgender Fragen:

1. Kann eine Wechselwirkung zwischen Huminstoffen und Phenolen nachgewiesen werden?
2. Unter welchen Bedingungen kommt es zu einer solchen Beziehung?
3. Welche Bindungsmechanismen werden wirksam?

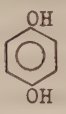
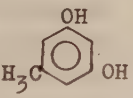
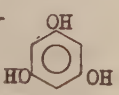
Der experimentelle Ansatz hatte weitgehend den Bedingungen des Bodens Rechnung zu tragen, um die Ergebnisse dann möglichst ohne Einschränkung auf natürliche Verhältnisse übertragen zu können. Würden aber im Experiment nur die äußeren chemischen und physikalischen Gegebenheiten des Mediums "Boden" simuliert, also nur mit

endoxydierten Huminsäuren gearbeitet, so würde ein wesentliches Motiv der Umsetzung organischer Stoffsysteme im Boden unterschlagen: die Dynamik der Huminstoffe (SCHEFFER, ULRICH, 1960). Hinzu kommt noch ein gewichtiger chemischer Aspekt. Eine zu erwartende Reaktion zwischen den Phenolen und der Huminsäure wird in der Phase der Bildung der Huminstoffe mit größerer Wahrscheinlichkeit eintreten als in der Endphase ihrer Biogenese, wenn sie als höhermolekulare, relativ reaktionsträge und immobile Stoffe vorliegen.

Es war also nicht nur sinnvoll, sondern auch notwendig, das Verhalten der Phenole gegenüber sich bildenden Huminstoffen am Modell zu prüfen, ganz besonders, da die Übertragbarkeit des Modells für die Genese der Huminstoffe als gesichert angesehen werden kann, denn das Auftreten mehr oder weniger reaktionsfreudiger Radikale bestimmt sowohl die Bildung der Huminstoffe im Boden als auch die Synthese in vitro. Auch ist durch zahlreiche physikalisch-chemische Untersuchungen eine sehr weitgehende Übereinstimmung synthetischer und natürlicher Huminstoffe gezeigt worden (LENTZ, ZIECHMANN, 1968; POLLACK, LENTZ, ZIECHMANN,1971). Wie weit bei dem hier verwendeten Ansatz die Übertragung der Ergebnisse vom Modell auf die natürlichen Huminsäuren möglich ist, konnte darüber hinaus noch experimentell geklärt werden.

Durch die unterschiedlichsten qualitativen und quantitativen Untersuchungsmethoden (Gaswechselmessungen, UV- und IR-Spektroskopie) war eine Wechselwirkung zwischen den sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon und den ausgewählten Phenolen in allen Fällen nachzuweisen. Schon hier zeigte sich aber das unterschiedliche Verhalten einzelner Gruppen der Phenole.

Tab.: 18 Maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz (ΔO_2 max) zwischen der Kombinationslösung und der Summe der Einzelkomponenten bei der Reaktion von sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon mit Phenolen

Gruppe	(1)	(2)	(3)
ΔO_2 max (µl)	-55 bis -67	-320 bis -769	+ 300 bis + 550
	Phenol	Hydrochinon 	Resorcin
	p-Kresol	Brenzkatechin	Ocrin 
		Pyrogallol	Phloroglucin 

Die Monohydroxyphenole (Gruppe 1) bedingen eine deutlich geringere Sauerstoffminderaufnahme, wenn sie mit den sich bildenden Huminstoffen zusammengebracht werden,als die in einer zweiten Gruppe zusammenzufassenden Phenole Hydrochinon, Brenzkatechin und Pyrogallol. Eine dritte abweichende Gruppe bilden die drei m-substituierten Phenole, die in der Kombinationslösung eine deutliche Sauerstoffmehraufnahme bewirken.

Eine Sauerstoffminderaufnahme in der Kombination,verursacht durch das Hinzufügen von Phenolen der Gruppe 1 oder 2, kann nur bedeuten, wenn alle übrigen Faktoren konstant gehalten sind, daß Anteile des hinzugefügten Phenols in der Kombinationslösung nicht mehr unter Sauerstoffaufnahme oxydieren können. Sie sind durch eine Bindung an die sich bildenden Huminstoffe in bezug auf die Sauerstoffaufnahme inaktiviert.

Die Phenole der Gruppe 3 nehmen mit Ausnahme des Phloroglucins allein unter den hier gewählten Bedingungen nur wenig oder gar keinen Sauerstoff auf. Ihre Oxydation unter Sauerstoffaufnahme wird also, wie die Mehraufnahme der Kombination anzeigt, durch die Anwesenheit der sich bildenden Huminstoffe vermehrt. Die Aktivierung kann nur durch eine Bindung der Phenolmoleküle an die Huminstoffe in statu nascendi hervorgerufen werden. Diese Interpretation der Gaswechselmessung erfährt dann eine volle Bestätigung durch die spektroskopischen Untersuchungen im ultravioletten und infraroten Bereich (siehe 3.2.2. und 3.2.3.).

Ausgehend von diesem Ansatz, es waren hier sowohl die Phenole als auch die Huminstoffe in optimaler Reaktionsbereitschaft, wurde das Verhalten der Phenole gegenüber ausgebildeten Huminsäuren geprüft, die zweifellos als erheblich reaktionsträger anzusehen sind.

Schon die ersten Gaswechselmessungen der Reaktionen zwischen der Modellhuminsäure und den Phenolen (siehe 3.3.1.) zeigen einen deutlichen Unterschied zu den Reaktionen der oben diskutierten Versuchsvarianten. Die maximalen Sauerstoffaufnahmedifferenzen (ΔO_2 max) der einzelnen Phenole untereinander sind erheblich kleiner, was sicherlich auf die geringere Reaktionsfähigkeit der ausgebildeten Huminsäuren zurückzuführen ist.

Ein direkter Vergleich dieser Werte mit den Differenzen aus den Oxydationsversuchen mit den sich bildenden Huminstoffen kann allerdings nicht gezogen werden, da die Mengen der gebildeten Huminstoffe und der eingesetzten Modellhuminsäuren nicht übereinstimmen.

Ein weiterer bemerkenswerter Unterschied tritt beim p-Kresol und bei Phloroglucin zutage.

Das p-Kresol bewirkt bei der Reaktion mit den sich bildenden Huminstoffen eine Sauerstoffminderaufnahme der Kombinationslösung (siehe Abb.3). Die Reaktion mit der fertigen Modellhuminsäure hingegen weist eine Sauerstoffmehraufnahme in der Kombination auf (siehe Abb.14). Es ist davon auszugehen, daß das p-Kresol durch die Reaktion mit den entstehenden Huminstoffen deren Bildung teilweise behindert, denn in der Einzelprobe nimmt das p-Kresol selbst keinen Sauerstoff auf. Durch die Knüpfung der Bindung des Kresols mit den noch kleineren Teilchen der Huminstoffe kann es deren Weiteroxydation unter Sauerstoffaufnahme beeinträchtigen. (Auch die Sauerstoffminderaufnahme des Phenols bei der Reaktion mit den sich bildenden Huminstoffen ist so zu erklären.)

Bei der Reaktion des Phloroglucins ist ein genau gegenteiliger Effekt festzustellen:
Durch die Huminstoffe in statu nascendi wird das Phloroglucin in der Sauerstoffaufnahme erheblich aktiviert (siehe Abb.3), während es durch die schon ausgebildeten Modellhuminsäureteilchen in der Oxydation behindert wird (Sauerstoffminderaufnahme in der Kombination gegenüber der Summe der Einzelaufnahmen; siehe dazu Abb.14).

Die Förderung der Sauerstoffaufnahme durch die sich bildenden Huminstoffe ist ebenfalls nur durch eine Bindung der Phenolmoleküle an den Huminstoff zu erklären: Das Phloroglucin, das schon in der Einzelprobe Sauerstoff aufnimmt - es bildet, verglichen mit den anderen m-substituierten Phenolen, relativ schnell Radikale -, wird in der Reaktionsfähigkeit dadurch gefördert, daß der Einfluß der m-Substitution durch die Bindung an die noch kleinen Huminstoffteilchen vermindert wird.

In den UV- und den IR-Spektren werden diese Ergebnisse wiederum voll bestätigt.

Wird davon ausgegangen, daß der absolute Betrag der maximalen Sauerstoffaufnahmedifferenz (ΔO_2 max) als Maß

für die Bindung der Phenole an die Huminsäure anzusehen ist, so kann, wenn die Differenz als Anteil von der maximalen Sauerstoffaufnahme des jeweiligen Phenols in der Einzelprobe ausgedrückt wird, ein "Vergleich" der Reaktivität der Phenole für die Reaktion mit der hier benutzten Huminsäure aufgestellt werden (Tab.19).

Sehr stark fallen das p-Kresol und das Resorcin heraus, die beide in der Einzelprobe keine Sauerstoffaufnahme zeigen, in der Kombination dann aber eine Sauerstoffmehraufnahme hervorrufen. Zu dieser Gruppe wäre auch noch das Orcin zu stellen, da es eine Beeinflussung der Sauerstoffaufnahme hervorruft, die weit über 100% der Einzelprobe beträgt.

Tab.: 19 Auswertung der Sauerstoffaufnahmedifferenz der Reaktion zwischen Modellhuminsäure und Phenolen

eingesetzte Phenole	ΔO_2max(µl)	max O_2 der Einzelprobe (µl)	%-Anteil v. ΔO_2max an O_2max
Phenol	--	--	--
p-Kresol	77	0	--
Hydrochinon	- 263	1050	25,05
Brenzkatechin	- 167	1175	14,21
Pyrogallol	- 76	1300	5,84
Resorcin	167	0	--
Orcin	87	65	133,84
Phloroglucin	- 220	475	46,31

Die übrigen Phenole (Hydrochinon, Brenzkatechin, Pyrogallol und Phloroglucin) stellen eine zweite Gruppe. Sie weisen alle eine mehr oder weniger kräftige Sauerstoffaufnahme in den Einzelproben auf, die dann durch die Reaktion mit der Modellhuminsäure vermindert wird. Daraus ist zu schließen, daß Phenole, die in dem hier verwendeten Medium in der Einzelprobe viel Sauerstoff auf-

genommen haben, durch die Reaktion mit der Huminsäure in der Sauerstoffaufnahme und damit der weiteren Oxydation behindert werden, wohingegen Phenole, die keiner oder nur einer geringen selbständigen Autoxydation unterliegen, durch die Bindung an die Huminsäuren zur Reaktion unter Sauerstoffaufnahme angeregt werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Betrachtung der relativen Redox-Potentiale (FIESER,1930) der hier verwendeten Phenole.

Tab.: 20 Vergleich der maximalen Sauerstoffaufnahmedifferenz und des kritischen Oxydationspotentials

reagierendes Phenol	kritisches Oxydationspotential (V)	ΔO_2 max (µl)
Phenol	1,089	--
p-Kresol	1,038	+ 77
Hydrochinon	0,715	-263
Brenzkatechin	0,742	-167
Pyrogallol	0,609	- 76
Resorcin	1,043	+167
Orcin	--	+ 87
Phloroglucin	0,799	-220

Ein Vergleich dieser Oxydationspotentiale mit der maximalen Sauerstoffaufnahmedifferenz (Tab.20) zeigt einen deutlichen Zusammenhang:
Ein niedriges kritisches Oxydationspotential (wie etwa Hydrochinon, Brenzkatechin, Pyrogallol und Phloroglucin) ist mit einer Sauerstoffminderaufnahme in der Kombination aus Phenol und Modellhuminsäure verbunden. Phenole mit einem hohen Potential hingegen (wie p-Kresol, Resorcin und sicher auch Orcin) ergeben unter gleichen Bedingungen eine Sauerstoffmehraufnahme in der Kombinationslösung.

Neben den oben beschriebenen Aspekten für die Bindung der Phenole an die Huminsäuren sind auch noch andere Faktoren zu berücksichtigen, wie das Beispiel des Pyrogallols zeigt. Hier ist trotz eines sehr niedrigen kritischen Oxydationspotentials nur eine relativ geringe Reaktionsfähigkeit in bezug auf die Bindung an die Huminsäure vorhanden. Dafür sind sicherlich die besonderen sterischen Verhältnisse der drei benachbarten Hydroxygruppen des Pyrogallols verantwortlich.

Daß es sich bei der Verbindung zwischen den hier ausgewählten Phenolen und der Huminsäure um eine stabile Bindung handelt, verbunden mit einer Teilchenvergrößerung der Huminsäure, weisen die Dünnschichtchromatogramme aus (siehe 3.3.5.). Noch deutlicher wird die Teilchenvergrößerung der Huminsäure durch die Auftrennung der Lösungen aus dem Oxydationsversuch mit Hydrochinon und Modellhuminsäure durch die Gelchromatographie in der Säule (siehe 3.3.6). Daß die aus der Kombinationslösung abgetrennte Fraktion der Huminsäure mit der auffallenden Teilchenvergrößerung keinerlei elektronenspektroskopisch sichtbare Veränderungen erkennen ließ, zeigt nur einmal mehr, wieweit die Huminsäure die neu hinzugekommenen Substanzen miteinbezieht.

Bei der Untersuchung des quantitativen Aspekts der Reaktion der Modellhuminsäure mit Hydrochinon (siehe S. 55) wird bei konstantem Huminsäuregehalt und steigender Hydrochinonmenge für die maximale Sauerstoffaufnahmedifferenz ein nicht proportionaler Anstieg ermittelt, wohingegen bei konstanter Hydrochinonkonzentration die Sauerstoffaufnahmedifferenz der Huminsäuremenge proportional ist.

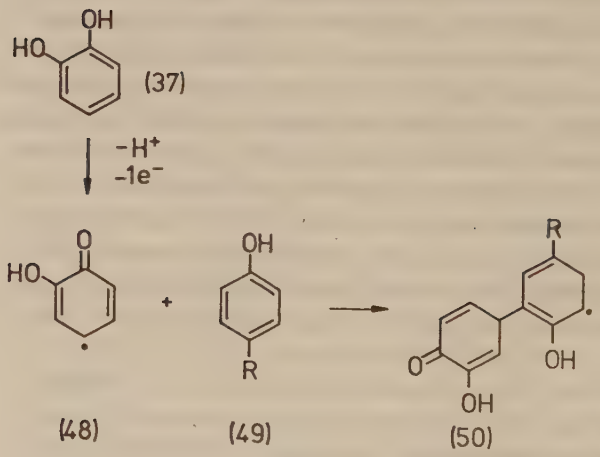
Diese exakt lineare Abhängigkeit des Effektes von der Huminsäurekonzentration zeigt, daß bei der Huminsäure ein "Strukturteil" vorhanden ist, das als direkter Reaktionspartner der eingesetzten Phenole wirkt.

Da durch die Methylierung der Modellhuminsäure die die Reaktion mit dem Hydrochinin kennzeichnende Sauerstoffminderaufnahme fast vollständig unterbleibt (siehe 3.4), kann durch den Einsatz von Modellsubstanzen für die methylierbaren und in der Modellhuminsäure vorhandenen Gruppen eindeutig die phenolische Hydroxygruppe als für die Reaktion an der Huminsäure ausschlaggebende funktionelle Gruppe ermittelt werden.

Dieses Ergebnis zeigt sich indirekt auch in der unterschiedlichen Sauerstoffaufnahmedifferenz bei dem Vergleich der Versuche mit der Modell- und der natürlichen Huminsäure. Die natürliche Huminsäure ergibt mit 8,8% gebundenem Hydrochinon einen um die Hälfte kleineren Wert als die Modellhuminsäure (17,2% gebundenes Hydrochinon), was ausschließlich auf den verminderten Gehalt an phenolischen OH-Gruppen in der natürlichen Huminsäure zurückzuführen ist. Das Auftreten der NH_2-Gruppe in den extrahierten Huminsäuren braucht nicht beachtet zu werden, da einerseits sowohl der hier auftretende Anteil sehr gering ist, als auch andererseits die Reaktivität in bezug auf die Bindung der Phenole erheblich geringer als die der phenolischen OH-Gruppe einzuschätzen ist.

Die Ergebnisse, die an den Modellhuminsäuren gewonnen wurden, sind qualitativ sehr gut auf die natürlichen Huminsäuren zu übertragen. Die spektroskopischen und chromatographischen Untersuchungen der Reaktionsprodukte aus der Oxydation des Hydrochinons mit der natürlichen Huminsäure führen zu einer weiteren Bestätigung. Durch die eindeutige Ermittlung der reaktiven Gruppe an der Huminsäure und anhand der Auswertung der Oxydationsversuche besteht die Möglichkeit, Mechanismen für die hier behandelten Reaktionen zu diskutieren. Es muß jedoch beachtet werden, daß die vorgestellten Reaktionen nur eine Möglichkeit darstellen, wie die sehr heterogen aufgebauten Huminstoffe reagieren können.

Die Phenole mit niedrigem kritischen Oxydationspotential reagieren mit der Huminsäure, nachdem sie ein Elektron abgegeben haben, also über die radikalische Zwischenstufe. Das einsame Radikalelektron wird nach der Knüpfung der Bindung in die Gesamtmesomerie des Huminsäureteilchens miteinbezogen, so daß für das gebundene Phenolmolekül eine Stabilisierung und damit eine Verminderung der Reaktivität die Folge ist.

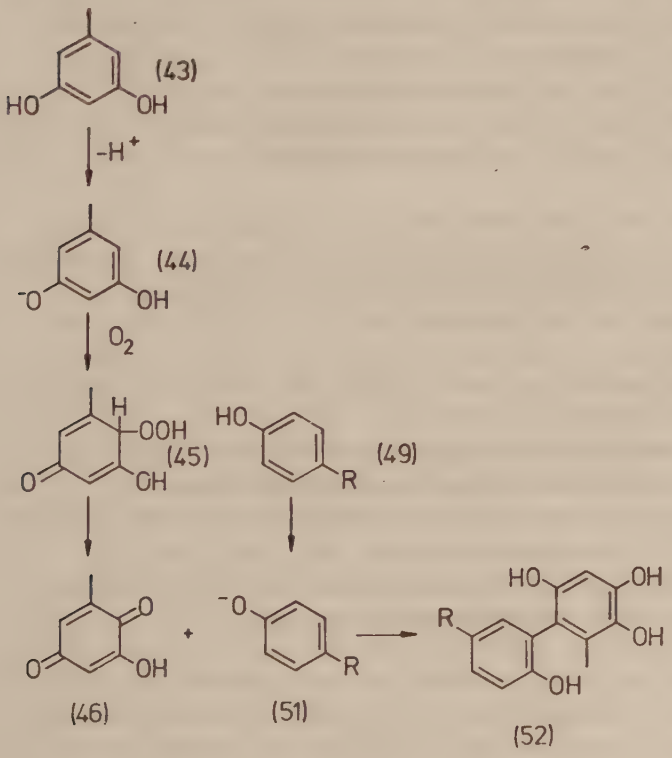


R = Huminsäure

Es wird hier z.B. das Brenzkatechin (37) durch Abstraktion eines Protons und eines Elektrons in das Radikal (48) überführt (es ist nur die mesomere Struktur genannt, die anhand der Spindichtemessungen als die wahrscheinlichste anzusehen ist). Dieses Radikal reagiert dann mit

einer phenolischen Randgruppe der Huminsäure (49) und bildet eine Hauptvalenzbindung aus (50). So wird verständlich, daß das freie Elektron, da es in die Gesamtmesomerie des Elektronensystems des Huminsäureteilchens einbezogen wird, erheblich an Reaktivität verliert.

Bei den Phenolen mit einem hohen Potential muß davon ausgegangen werden, daß eine Radikalisierung der Phenolmoleküle vor der Reaktion der Huminsäure in diesem Milieu unwahrscheinlich ist. Durch die Bindung dieses relativ reaktionsträgen Systems an die Modellhuminsäure wird es aufgrund der Elektronen-Donator-Eigenschaften der Huminsäure (ZIECHMANN, 1971, 1972) aktiviert, so daß eine Weiterreaktion unter Sauerstoffaufnahme erfolgen kann.



R = Huminsäure

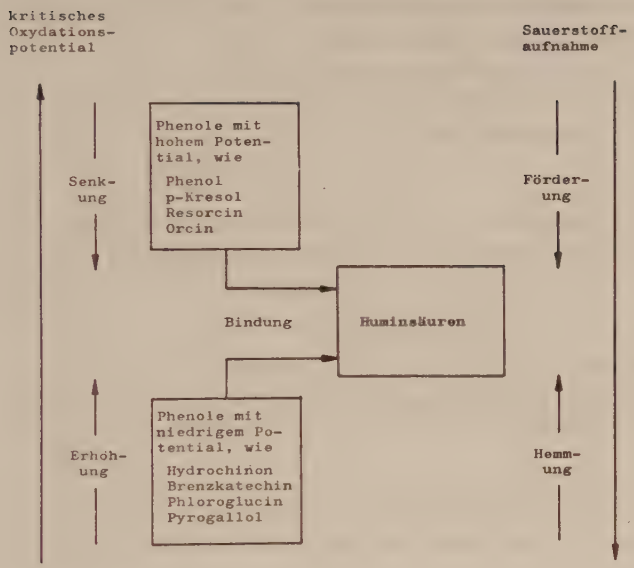
Das Orcin (43), stellvertretend für die Phenole mit hohem Potential, wird über (44), (45) zu (46) umgewandelt und kann aus dieser Struktur heraus mit (51), der Phenolatgruppe der Huminsäure, reagieren.

Die hier als Beispiel für die phenolische Gruppe der Huminsäure gewählte monohydroxy-Struktur kann natürlich auch durch einen para - dihydroxy - oder ortho - dihydroxy -Rest ersetzt werden, ohne daß sich die Reaktionsmechanismen grundlegend ändern.

Es ist somit davon auszugehen, daß die Huminsäure durch ihr unterschiedliches Verhalten gegenüber den einzelnen Phenolen die Differenzierung bei der Sauerstoffaufnahmedifferenz hervorruft. Die Huminsäure verhält sich gegenüber den Phenolen mit niedrigem kritischen Oxydationspotential (Hydrochinon, Brenzkatechin, Pyrogallol und Phloroglucin) als Elektronenakzeptor, andererseits aber auch den Phenolen mit hohem Potential gegenüber (p-Kresol, Resorcin, Orcin) als Elektronendonator (Schema 4).

Weiter läßt sich jetzt auch das kritische Oxydationspotential der hier benutzten Modellhuminsäure abschätzen, denn es muß größer als 0,8 V (die Huminsäure ist gegenüber dem Phloroglucin noch deutlich Elektronenakzeptor) und kleiner als 1 V sein (dem p-Kresol gegenüber wirkt die Huminsäure schon als Elektronendonator).

Eine deutliche Bestätigung erfährt die Aussage, daß eine Kopplung des mesomeren Elektronensystems der Huminsäure mit dem gebundenen Phenolmolekül stattfindet, durch die Fluoreszenzspektren. Ganz besonders muß hier das Ergebnis des nach LAUTSCH u.a. (1959) durchgeführten Versuchs hervorgehoben werden.



Schema 4 Vergleich des kritischen Oxydationspotentials und der Sauerstoffaufnahme einiger Phenole bei der Bindung an Huminsäuren

Obwohl Leitungsphänomene bereits in der Form der elektrischen Leitfähigkeit von LENTZ, ZIECHMANN (1968) und HELLBERG nachgewiesen wurden, stand der Nachweis der Energieleitung zwischen einem "Empfänger", hier das gebundene Resorcin, und dem Huminstoff noch aus.

Jetzt ist auch zu erklären, daß die isolierten Verbindungen aus den Phenolen und der Huminsäure absorptionsspektroskopisch nicht nachzuweisen sind: Durch die Bindung wird das Elektronensystem des Phenols soweit mit dem durch umfangreiche Mesomerie gekennzeichneten Elektronensystem der Huminstoffe verknüpft, daß es seine Eigenstän-

digkeit vollständig verliert. Diese Eigenschaft der Huminsäuren, Fremdsubstanzen so stark in den eigenen Molekülverband mit einzubeziehen, daß sie als solche nicht mehr zu identifizieren sind, kennzeichnet die Universalität der Huminstoffe.

5. Zusammenfassung

1. Zwischen ausgewählten Phenolen und sich bildenden Huminstoffen aus Hydrochinon konnten durch Gaswechselmessungen in der Warburg-Apparatur und spektroskopische Untersuchungen im UV- und IR-Bereich Wechselwirkungen im Reaktionsmedium Phosphatpuffer pH 8,0 festgestellt werden.

2. Ausgebildete Huminsäuren zeigen in diesem Medium ebenfalls eine Wechselwirkung mit den Phenolen, die auf folgende Weise nachgewiesen wird:

   a) Gaswechselmessung: In der Warburg-Apparatur zeichnet sich die Kombinationslösung aus den Phenolen und der Modellhuminsäure durch Sauerstoffmehr- bzw. -minderaufnahmen gegenüber der Summe der Einzelkomponenten aus.

   b) UV-Spektren: Die Kombination zeigt Mehr- bzw. Minderabsorption gegenüber der Summe der Einzelabsorptionen.

   c) IR-Spektren: Hier treten in der Kombination neue Banden, Bandenverschiebungen auf oder es verschwinden Banden aus dem Spektrum, jeweils verglichen mit den Spektren der Einzelkomponenten.

   d) Fluoreszenzspektren: Es werden Unterschiede in der Fluoreszenzintensität festgestellt. Durch den Vorgang der Energieleitung kann eine feste Bindung nachgewiesen werden.

   e) Dünnschichtchromatographie und Gelfiltration: Es wird eine Teilchenvergrößerung der eingesetzten Huminsäure durch die Bindung der Phenolmoleküle festgestellt.

3. Durch den Einsatz von methylierter Huminsäure und von "Strukturteilen" der Huminsäure kann die phenolische Hydroxygruppe als für die Reaktion notwendige funktionelle Gruppe der Huminsäure ermittelt werden.

4. Es wird die Übertragbarkeit der an Modellhuminsäure gewonnenen Ergebnisse auf die natürlichen Huminsäuren gezeigt.

5. Ein Vergleich der maximalen Sauerstoffaufnahmedifferenzen der einzelnen Versuche mit den unterschiedlichen Phenolen mit ihren kritischen Oxydationspotentialen zeigt:
   Phenole mit niedrigem Potential bedingen bei der Reaktion eine Sauerstoffminderaufnahme.
   Phenole mit hohem Potential bewirken bei der Reaktion mit Huminstoffen eine Sauerstoffmehraufnahme.

6. Der Huminstoff wirkt auf die gebundenen Phenole mit niedrigem Potential als Elektronenakzeptor, hemmt also deren weitere Reaktion, während er auf die Phenole mit hohem Potential als Elektronendonator wirkt und deren weitere Oxydation begünstigt.

7. Das kritische Oxydationspotential der Huminstoffe wird in den Bereich zwischen 0,8 und 1,0 V eingeordnet.

8. Für die Bindung der Phenole an die Huminstoffe werden zwei Reaktionsmechanismen als Beispiele für weitere mögliche diskutiert.

6. Anhang

Elektronenspektren

Zur Aufnahme der Elektronenspektren wurde das PERKIN-ELMER Recording Spektrophotometer EPS-3T verwendet. Die Substanzen wurden in Quarzküvetten der Schichtdicke 0,5 cm und 1 cm vermessen.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit den Grating Infrared Spectrophotometer 457 der Firma PERKIN-ELMER erstellt. Die Probe wurde als Festkörper (Substanz vermischt mit 300 mg KBr und bei 10 Kp/cm^2 gepreßt) vermessen.

Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Fluoreszenzspektrophotometer 204 der Firma PERKIN-ELMER aufgenommen. Die Lösungen wurden in fluoreszenzarmen Quarzküvetten vermessen.

Gaswechselmessungen

Die Gaswechselmessungen wurden in einer Warburg-Apparatur der Firma BRAUN-MELSUNGEN durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Die chromatographischen Auftrennungen wurden auf Celluloseplatten ohne Fluoreszenzindikator mit der Schichtdicke 0,10 mm der Firma E.MERCK, Darmstadt durchgeführt (Artikel Nr.5577).

Gelchromatographie

Die Auftrennung in der Säule wurde an SEPHADEX - LH 20 Gel der Firma PHARMACIA FINE CHEMICALS AB, Uppsala durchgeführt.

Herstellung der Modellhuminsäuren

Es werden 200 g Hydrochinon in 5 l Wasser gelöst und die Lösung wird dann mit NaOH-Plätzchen auf einen pH-Wert von ca 11-12 eingestellt. Der pH-Wert wird im weiteren kontrolliert und - wenn notwendig - wiedereingestellt. Die Lösung wird einer 4-tägigen Oxydation unter kräftiger Rührung unterworfen.

Mit HCl wird die Lösung auf pH 1 eingestellt und die ausfallenden Huminsäuren werden abfiltriert.

Der Niederschlag wird mit dest.Wasser in Dialyseschläuche eingefüllt und gegen Wasser bis zur Chlor-Freiheit dialysiert (Dauer: ca 3 - 4 Tage).

Die so gereinigten Huminsäuren werden im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Die Ausbeute beträgt in der Regel 5 - 10% der eingesetzten Hydrochinonmengen. Durch das Dialysieren werden neben den ClH-Ionen auch niedermolekulare Teilchen abgetrennt, die bei der Füllung den Huminsäuren anhaften.

Da diese Huminsäuren nur in sehr begrenztem Maße in Wasser löslich sind, wurde das besser lösliche Na-Salz hergestellt.
Dafür wird die Huminsäure - soweit möglich - in Wasser gelöst und mit verd. NaOH auf genau pH 7,0 titriert, wobei sich die restlichen HS dann auch lösen. Diese Lösung wird im Rotationsverdampfer bei max 40°C eingedampft.

Gewinnung der natürlichen Huminstoffe

Bodenfeuchte Torfproben aus dem Wachstumskomplex des Sonnenberger Moors werden in Säulen gefüllt und nacheinander mit Wasser, Salzsäure (pH 1), Wasser, Natronlauge (pH 14) extrahiert (siehe dazu MÜLLER, 1972). Aus dem NaOH-Extrakt wird durch Ausfällen (Ansäuern mit Hcl auf ca.pH 1-2) und Abfiltrieren die Huminsäure gewonnen. Sie wird in Dialyseschläuche gefüllt und gegen Wasser dialysiert, bis die verbleibende Suspension chlorfrei ist. Um eine ausreichende Löslichkeit in Puffer pH 8,0

zu erreichen und auch eine Verschiebung des pH-Wertes auszuschließen, wird auch hier das Na-Salz hergestellt (siehe dazu: Herstellung der Modellhuminsäuren).

Methylierung der Modellhuminsäure

Die Methylierung erfolgt nach KHAN. Sie wird mit aus frisch hergestelltem Nitrosomethylharnstoff gewonnenem Diazomethan durchgeführt.

500 mg Huminsäure werden in 40 ml Methanol und 4 ml dest.Wasser gelöst. Das in Äther gelöste Diazomethan aus 10,3 g Nitrosomethylharnstoff wird zu der bereiteten Huminsäurelösung gegeben und über Nacht stehengelassen. Überschüssiges Diazomethan wird vorsichtig abgedampft und die Huminsäure im Vakuum getrocknet.

7. Literaturverzeichnis

ALEKSANDROVA, L.N. (1962)
Present-day ideas on the nature of soil humus substances and their organomineral derivatives
in: Problemy Pochvovedeniya, Izd. Akad.Nauk SSSR
zit. n. KONONOVA 1966

ARKLEY, V., F.M.DEAN, A.ROBERTSON, P.SIDISUNTHORN (1956)
Usnic acid. Part XII. Pummerer's ketone
J.Chem. Soc., 2322-2328

BARTON, D.H.R., T.COHEN (1957)
Some biogenetic aspects of phenol oxidations
Festschrift Arthur Stoll, Basel, 117-143

BARTON, D.H.R., A.M.DEFLORIN, O.E.EDWARDS (1955)
Synthesis of usnic acid
Chem.& Ind., 1039-1040

BARTON,D.H.R., A.M.DEFLORIN, O.E.EDWARDS (1956)
The synthesis of usnic acid
J.Chem.Soc., 530-534

BELLAMY, L.H. (1966)
Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution
Darmstadt

BRIDGES, J.W. (1963)
Spectrofluoromety with particular reference to the fluorescence of the phenols
in: J.B.PRIDHAM, Methods in polyphenol chemistry, Proceedings of the Plant Phenolics Group Symposium
Oxford

DIEBLER, H., M.EIGEN, P.MATTHIES (1961)
Chemische Relaxation im Redoxgleichgewicht Chinon - Hydrochinon
Z.Elektrochem., 65, 634-635

DIMROTH, K., A.BERNDT (1964)

Die Konstitution des dimeren 2.4.6 - Triphenylphenoxyls
Angew.Chem. 76, 434

EIGEN, M., P.MATTHIES (1961)

Über Kinetik und Mechanismus der Primärreaktion der Zersetzung von Chinon in alkalischer Lösung

Chem.Ber. 94, 3309

ENDERS, C. (1942,a)

Über den Chemismus der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen

Biochem.Z. 312, 339-348

ENDERS, C. (1942,b)

pH-Abhängigkeit und Gleichgewichtsreaktion der Aufspaltung zu Methylglyoxal

Biochem.Z. 312, 349-353

ENDERS, C. (1943)

Über den Chemismus bei der Huminsäurebildung unter physiologischen Bedingungen. IV. Mitteilung: Die Rolle der Mikroorganismen bei den Humifizierungsvorgängen

Biochem. Z. 315, 259-292

ENVIRONMENTAL POLLUTION (1971)

Science information exchange, Smithsonian Institution, Washington D.C.

FAUST, S.D. (a)

Recovery, separation and idenfication of phenolic compounds

zit. n.: Environmental pollution

FAUST, S.D. (b)

Recovery, separation and idenfication of phenolic compounds from polluted waters

zit. n.: Environmental pollution

FIESER, L. (1930)

An indirect method of studying the oxidation-reduction potentials of unstable systems, including those from the phenols and amines

J.Amer. Chem. Soc. 52, 5204-5241

FLAIG, W.,E.SAALBACH (1955, a)

Zur Kenntnis der Huminsäuren. X. Mitteilung. Über den Einfluß des Thymohydrochinons als Modellsubstanz von Vorstufen bzw. Abbauprodukten von Huminsäuren auf das Wurzelwachstum von Sommerweizen.

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 71, 208-215

FLAIG, W., E.SAALBACH (1955, b)

Zur Kenntnis der Huminsäuren. XI. Mitteilung. Die Beeinflussung der Keimung von Getreide durch Thymohydrochinon als Modellsubstanz von Vorstufen bzw. Abbauprodukten von Huminsäuren

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 71, 215-224

FLAIG, W., E.SAALBACH, U.SCHOBINGER (1960)

Zur Kenntnis der Huminsäure. XIX. Mitteilung. Über den Einfluß von Kaltwasserextrakten aus unterschiedlich lange gerottetem Weizenstroh auf das Anfangswachstum und die Nährstoffaufnahme von Roggenkeimpflanzen

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 88, 232 - 236

FLAIG,W., K.SCHARRER, G.SCHOLL (1957 a)

Zur Kenntnis der Huminsäuren. XV. Mitteilung Über den Einfluß von Thymohydrochinon als Modellsubstanz von Humusstoffen auf den Kohlenhydratstoffwechsel von Getreide

Z.Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 76, 193-200

FLAIG,W., K.SCHARRER, G.SCHOLL (1957 b)

Zur Kenntnis der Huminsäuren. XVII. Mitteilung Über den Einfluß von Thymohydrochinon als Modellsubstanz von Humusstoffen auf die Phosphataufnahme von Roggenkeimpflanzen.

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 76, 210-212

GÄNSHIRT, H.

in: E.STAHL (1967)

Dünnschichtchromatographie
Berlin, Heidelberg, New York

HAAN, H.De (1972)

Molecule-size distribution of soluble humic compounds from different natural waters

Freshwat. Biol. 2, 235-241

HAYNES, C.G., A.H. TURNER, W.A. WATERS (1956)

The oxidation of monohydric phenols by alkaline ferricyanide

J. Chem. Soc., 2823-2831

HELBERG, H.-W.

pers. Mitteilung

HEWGILL, F.R., B.R. KENNEDY (1966)

Oxidation of alkoxy-phenols. Part VI. A hemi-acetal from 4-methoxy-2-t-butyl-phenol

J.Chem.Soc., C, 362-366

HORNER, L., W. DÜRKHEIMER (1959)

Zur Kenntnis der o-Chinone XV. Zum Mechanismus der Purpurogallin-Bildung

Z. Naturforschung, 14b, 744-746

HORNER, L., K.H.WEBER, W. DÜRKHEIMER (1961)

Zur Kenntnis der o-Chinone XIX. Hydrolysestudien an 2-substituierten 1.3-Dicarbonalverbindungen als Beitrag zum Mechanismus der Purpurogallinbildung

Chem. Ber. 94, 2881-2887

KHAN, S.H. (1968)

Physikalisch-chemische Untersuchungen an chemisch veränderten Huminstoffen

Dissertation Göttingen

KLEIST,H., D.MÜCKE (1966 a)

Optische Untersuchungen an Huminsäuren

Albrecht-Thaer-Archiv 10, 471-484

KLEIST, H., D.MÜCKE (1966 b)

Stabile freie Radikale in Huminsäuren

Experientia 22, 136-139

KONONOVA, M.M. (1966)

Soil organic matter

New York

KONONOVA, M.M., I.V. ALEKSANDROVA (1956)

The use of paper partition chromatographie for the study of the forms of nitrogen in humus substances

Pocvovedenie 5 , 86-92

KONONOVA, M.M., I.V. ALEKSANDROVA (1958)

The biochemistry of humus formation and some problems of plant nutriation

Izd. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. 1, 79
zit. n. KANONOVA 1966

KRAMER, W.(1965)

Die Aktivitätsbeeinflussung der Urease durch O-funktionelle Modellsubstanzen und Huminsäuren

Dissertation Göttingen

KRESS, B. (1970)

Zur Analyse der Huminstoffbildung unter extremen Bedingungen

Dissertation Göttingen

KUNDZIN, S.F., F.F.NORD (1951)

Investigation on lignin and lignification
IV. Studies on hard wood lignin

J. Amer. Chem. Soc. 73, 660-693

LADIK, J. (1972)

Quantenbiochemie für Chemiker und Biologen
Stuttgart

LAUTSCH,W., R.PACEDAY, I.SOMMER, H.J.JULIUS, N.BODEFELD (1959)

Chimia 13, 129
zit. n. LADIK (1972)

LENTZ,H., W. ZIECHMANN (1968)

Physikalisch-chemische Untersuchungen von Huminstoffen

Brennstoff-Chemie 49, 40

LEVESQUE, M. (1972)

Fluorescence and gelfiltration of humic compounds

Soil Sci. 113, 346-353

MARCUSSON, J. (1925)

Struktur und Bildung der Huminsäuren und Kohlen

Ber.Dtsch. Chem. Ges. 58, 869-872

MECKE, R.

zit. n. DMS, Arbeitsatlas der Infrarotspektroskopie

Weinheim, 1972, Spektrum Nr.2854

MÜLLER, E., K.SCHURR, K.SCHEFFLER (1959)

Über Sauerstoffradikale XIII. Dehydrierung von Phenanthrolen

Ann. 627, 132-141

MÜLLER, U. (1972)

Alkalilösliche Huminstoffe in Torfen

unveröffentlichte Diplomarbeit Göttingen

MÜLLER-WEGENER,U. (1974)

Huminstoffspektrum eines Harzhochmoores

Mitteilungen der Deutschen Bodenkundl. Gesellsch. 18, 252-257

MUSSO, H. (1963)

Über Phenol-Oxidationen

Angew.Chem. 75, 965-977

MUSSO, H. (1967)

Phenol coupling

in: W.I.TAYLOR, A.R.BATTERSBY, Oxidativ coupling of phenols, New York, 1967

NAUCKE,W., F. TARKMANN (1964)

Gaschromatographische Bestimmung der Abwasserphenole, besonders in Torf-Schwelwässern

Brennstoff-Chemie 45, 263-269

NIERENSTEIN,M. (1915)

An oxidationproduct of pyrogallol

J. Chem. Soc. 107, 1217-1220

OTTO, H. (1952)

Einwirkung von Vorstufen der Synthese-Huminsäuren auf das Wurzelwachstum

Z.Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 56, 46-49

POLLACK,S., H. LENTZ, W.ZIECHMANN (1971)

X - ray diffraction study of humic acids

Soil Science 112, 318-324

PUMMERER,R., H.PUTTFARCKEN, P.SCHOPFLOCHER (1925)

Die Dehydrierung von p-Kresol. (VIII. Mitteilung über die Oxidation der Phenole)

Ber.Dtsch. Chem.Ges. 58, 1808-1820

RANDERATH, K. (1972)

Dünnschichtchromatographie

Weinheim/Bergstr.

ROCHUS, W. (1971)

Influence of different humic substances on groth and phosphat uptake by cereal plants

Transaction of the international symposium Humus et Planta V, Prag, 535-539

SAALBACH, E. (1955)

Über die Ursachen der Förderung des Sproßwachstums von Hafer durch Polyoxyanthrachinone

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 69, 246-255

SALFELD, J.C. (1957)

Zum Reaktionsmechanismus der Purpurogallin-Bildung

Angew.Chem. 69, 723-724

SCHEFFER,F., B.ULRICH (1960)

Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde
III.Teil
Humus und Humusdüngung
Stuttgart

SCHEFFER,F., E.WELTE (1950)

Über absorptionschromatographische Untersuchungen an natürlichen Huminsäuren

Landwirtschaftliche Forschung 1, 81

SCHEFFER,F., E.WELTE, W.ZIECHMANN (1955)

Über Untersuchungen an künstlichen Huminsäuren

Z.Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 69, 58-65

SCHLEGEL, H.G. (1976)

Allgemeine Mikrobiologie
Stuttgart

SEAL, B.K., K.B.ROY, S.K.MUKHERJEE (1964)

Fluorescence emission spectra and structure of humic and fulvic acids

Jour.Indian Chem. Soc. 41, 212-214

SEPHADEX - LH - 20 (1973)

Pharma fine chemicals, Uppsala

SEPHADEX (1974)

Gelfiltration in theory and praxis

Pharma fine chemicals, Uppsala

SÖCHTIG, H. (1966)

Zur Fraktionierung von Huminstoffen durch Gelfiltration

Landbauforschung Völkenrode 16, 25-30

STADNIKOFF, G. (1930)

Neuere Torfchemie

Moskau

STEELINK, C. (1966)

Electron paramagnetic studies of humic acids and related model compounds

Advances chem.ser. (Coal science) 55, 80-90

STEELINK, C., G.TOLLIN (1962)

Stable free radicals in soil humic acid

Biochem. et Biophys. Acta 59, 25-34

STONE, T.J., W.A. WATERS (1964)

Aroxyl-radicals. Part I. Electron spin resonance spectra of radicals from some substituted monohydric phenols

J. Chem. Soc. 213-218

WALLACE, A., R.T.ASHCROFT (1956)

o.w.A.
Soil Sci. 82, 233

WATERS, W.A. (1964)

Mechanismus of oxidation of organic compounds
London

WEST, W. (1956)

Fluorescence and phosphorescence

in: Chemical applications of spectroscopy,
Technique of organic chemistry IX, New York

ZIECHMANN, W.

Pers. Mitteilung

ZIECHMANN,W. (1956)

Die Darstellung von Huminsäuren im heterogenen System mit neutraler Reaktion

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 84, 155-158

ZIECHMANN, W. (1960 a)

Über Modellreaktionen zur Bildung synthetischer Huminsäuren. I. Die Synthese von Huminsäuren in alkalischem Milieu

Brennstoff-Chemie 41, 289-293

ZIECHMANN,W. (1960 b)

Über Modellreaktionen zur Bildung synthetischer Huminsäuren II. Die Synthese von Huminsäuren in neutralem Milieu

Brennstoff-Chemie 41, 334-340

ZIECHMANN,W. (1961)

Gewinnung, Charakterisierung und Auftrennung von Huminsäuren

Z.f.analyt.Chem. 181, 503-513

ZIECHMANN, W. (1963)

Über Aufbau und Eigenschaften des Systems der Huminstoffe

Brennstoff-Chemie 44, 52-58

ZIECHMANN,W. (1971)

Humic substances as donor-acceptor-complexes
Transaction of the international symposium Humus et Planta V, Prag, 305-310

ZIECHMANN,W. (1972)

Über die Elektronen Donator- und Akzeptor-Eigenschaften von Huminsäuren

Geoderma 8, 111-131

ZIECHMANN, W. (1974)

Der Abbau organischer Stoffe im Boden

Der Chemieunterricht 5, 26-68

ZIECHMANN, W., G.PAWELKE (1959)

Zum Vergleich natürlicher und synthetischer Huminsäuren und ihrer Vorstufen

Z. Pflanzenern., Düng., Bodenkunde 84, 174-184

ZIECHMANN,W, W.ROCHUS (1971)

Über die Bildung und Eigenschaften von Huminstoffen

Tonind.-Ztg. 95, 69-78

ZIECHMANN,W., H.SCHOLZ (1960)

Spektroskopische Untersuchungen an Huminsäuren
Naturwissenschaften 47, 193-196

L E B E N S L A U F

9. 8. 1947	Geboren in Bremen als Sohn des Studiendirektors Heinz Georg Müller und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Hamisch
1954 - 1958	Besuch der Volksschule in Bremen
1958 - 1967	Besuch des Gymnasiums in Bremen
1967 - 1969	Studium der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg
1969 - 1972	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
10. 7. 1972	Diplom-Hauptprüfung im Fach Biologie
Nov. 1972	Beginn meiner Tätigkeit als Doktorand
Nov. 1973	Beginn meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent am Interfakultativen Lehrgebiet Chemie der Universität Göttingen

Herrn Prof. Dr. W. Ziechmann möchte ich für die mannigfaltige Unterstützung und die kritische Diskussion, die diese Untersuchungen begleiteten, ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. H. Ellenberg danke ich besonders für die Ausbildung und die Förderung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Interfakultativen Lehrgebiets Chemie danke ich für vielfältig bewiesene Hilfsbereitschaft.